



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Identificación de genes y elementos genéticos repetitivos
diferencialmente expresados en la extremidad regenerativa
de ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) jóvenes y adultos**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Biólogo

PRESENTA

Samuel Ruiz Pérez

TUTOR:

Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra

Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México

2024





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos

1. Datos del alumno

Nombre: Samuel
Apellido paterno: Ruiz
Apellido materno: Pérez
Número de cuenta: 420004169
Carrera: Licenciatura en Biología
Facultad: Facultad de Ciencias
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
ORCID iD:  0000-0002-5577-8341

2. Datos del tutor y secretario

Título: Dr.
Nombre: Rodrigo
Apellido paterno: González Barrios
Apellido materno: de la Parra
ORCID iD:  0000-0001-8982-6586

3. Datos de la presidenta

Título: Dra.
Nombres: Ana Brígida Clorinda
Apellido paterno: Arias
Apellido materno: Álvarez
ORCID iD:  0000-0002-5873-2904

4. Datos del vocal

Título: Dr.
Nombre: Ernesto
Apellido paterno: Soto Reyes
Apellido materno: Solís
ORCID iD:  0000-0002-4219-6406

5. Datos de la suplente 1

Título: Dra.
Nombre: Eria Alaide
Apellido paterno: Rebollar
Apellido materno: Caudillo
ORCID iD:  0000-0001-8827-023X

6. Datos de la suplente 2

Título: Dra.
Nombre: Adriana
Apellido paterno: Garay
Apellido materno: Arroyo
ORCID iD:  0000-0003-1575-6284

7. Datos del trabajo escrito

Título: Identificación de genes y elementos genéticos repetitivos diferencialmente expresados en la extremidad regenerativa de ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) jóvenes y adultos
Número de páginas: 183
Año: 2024

A mi mamá y a mi papá

A mis hermanas

De esta manera cuentan que Xólotl no quería morir, les dijo a los dioses: “Oh dioses, que no muera yo”. Lloraba muchísimo, se le hincharon los ojos, se le hincharon las cejas. Y ya le llega la muerte, huyó, corrió, se metió con rapidez entre las espigas de maíz, tomó la forma de éste, por eso se convirtió con rapidez en el maíz doble, bifurcado, el campesino lo llama *xolotl*. Y fue visto allá, entre las espigas de maíz, otra vez huyó: nuevamente se metió con rapidez entre los magueyes, en consecuencia, se volvió maguey, es el [maguey] doble, su nombre es *mexolotl*. Otra vez fue visto: nuevamente se metió en el agua, fue a convertirse en el *axolotl*, [y] allí realmente fueron a atraparlo, por consiguiente lo mataron.

Códice Florentino (de Sahagún, 1577a)
Traducción del náhuatl al español (Torres López, 2019)



Hay unos animalejos en el agua que se llaman *axolotl*. Tienen pies y manos como lagartijas y tienen la cola como anguila y el cuerpo también; tienen muy ancha la boca y barbas en el pescuezo. Es muy bueno de comer, es comida de los señores.

Códice Florentino (de Sahagún, 1577b)

Mis ajolotes
miran a la eternidad
entre la niebla.

@AxolotlBot (2020)

Agradecimientos

Al Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra, por darme la oportunidad de unirme a su grupo de investigación y por guiarme y supervisarme durante la realización de este proyecto. Además, por permitirme participar en colaboraciones con otros investigadores y por siempre instruirme y aconsejarme en el mundo de la (epi)genómica y la academia.

A mis sinodales: la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, el Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, la Dra. Eria Alaide Rebollar Caudillo y la Dra. Adriana Garay Arroyo, por sus invaluable críticas durante la evaluación de mi trabajo. Sus comentarios han enriquecido enormemente esta tesis.

A la Dra. Alejandra Cervera Taboada y el Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, por facilitarme el acceso a servidores de computación de alto rendimiento para realizar los análisis bioinformáticos de este proyecto.

Al Dr. Nicolás Alcaraz Millman, por orientarme en todo lo relacionado con los análisis bioinformáticos y por su inmenso apoyo académico y personal durante mi estancia en la Universidad de Copenhague.

A mis amigos del Laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología y colaboradores externos: Ale, Ana, Bere, Beto, Karla, Magy, Manuel, Michelle, Mich, Paulina y Victoria, por sus valiosos comentarios y ayuda durante la realización de este trabajo y mi estancia en el laboratorio. Asimismo, a Erick I. Navarro Delgado, por introducirme al laboratorio y aconsejarme en mis primeros pasos en la investigación.

A los profesores del Taller de Ciencias Genómicas: de Moléculas a Ecosistemas, sobre todo al Dr. Pablo Vinuesa, el Dr. Damien Formey y la Dra. Eria Rebollar, por permitirme continuar desarrollando este proyecto y por sus enseñanzas en la genómica.

A los profesores de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su dedicación y esfuerzo en la formación de los estudiantes. Especialmente, al Dr. Antonio Castellanos Ramírez, por impartir una de mis clases favoritas de la carrera y por enseñarme un poco del mundo de la física.

Agradecimientos

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias, sobre todo a Ángel y Sofi, por ser mis amigos desde el principio.

A mis amigos de los cursos de Alemán en la ENALLT, en especial a Karla, Ismael y Miguel, por sus chistes y por hacer del aprendizaje del idioma una experiencia inolvidable.

Al Dr. Jorge Alberto Lugo de la Fuente y a todo el equipo de profesores de la Olimpiada de Biología del Estado de México, por mostrarme lo asombrosa que es la biología y por su esfuerzo de décadas y absoluta entrega en la formación de las próximas generaciones de biólogos y científicos.

A mis compañeros y amigos de las etapas estatales, nacionales e internacionales de la Olimpiada de Biología, por inspirarme a ser un mejor biólogo y científico.

A mis amigos de la preparatoria, sobre todo a Diana, Wendy, Roberto y Yoshua, por su cariño, energía y las risas compartidas.

A Cristian Zuppa Gutiérrez, por ser mi primer gran profesor de Biología.

A Luis Mendoza Casas, por brindarme alojamiento y todo su apoyo durante la licenciatura.

A Luisa, por quererme y acompañarme todos estos años.

A mi prima Pili, a Federico, a Freddie y a mi tita Pilar, por quererme y por apoyarme en tantas ocasiones.

A mi tío Antonio Jesús, por su cariño y sus esfuerzos para contribuir a mi educación.

A mis hermanas, por ser mis amigas eternas, por quererme, por hacerme reír y por confiar en mí.

A mi papá y a mi mamá, por dármelo todo en esta vida, por ser mis ejemplos, por siempre confiar en mí y por su amor incondicional.

Índice general

Índice de figuras	XI
Índice de cuadros	XIII
Resumen	XIV
Resumen gráfico	XV
Abstract	XVI
Graphical abstract	XVII
1. Introducción	1
1.1. La regeneración animal	1
1.2. El ajolote mexicano (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	3
1.2.1. La regeneración de las extremidades en el ajolote mexicano	4
1.2.2. La disminución de las capacidades regenerativas como efecto del envejecimiento	12
1.3. Los elementos repetitivos eucariotas	17
1.3.1. Los elementos repetitivos y la regeneración	23
1.3.2. Los elementos repetitivos y el envejecimiento	29
2. Planteamiento del problema	32
3. Hipótesis	33
4. Objetivos	34
4.1. Objetivo general	34
4.2. Objetivos particulares	34
5. Métodos	35
5.1. Obtención de muestras biológicas de ajolotes nativos	35
5.2. Extracción y secuenciación de RNA	37
5.3. Incorporación de datos de RNA-seq externos	38
5.4. Análisis bioinformático	38
5.4.1. Anotación funcional del proteoma y descarga de anotaciones genómicas del ajolote	40

5.4.2.	Análisis de datos de secuenciación de RNA	41
5.4.2.1	Análisis de expresión diferencial de genes y elementos repetitivos	42
5.4.2.2	Anotación del contexto genómico de elementos repetitivos dife- rencialmente expresados	43
5.4.2.3	Anotación de los dominios proteicos de elementos repetitivos diferencialmente expresados	44
5.4.2.4	Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes basado en expresión diferencial	45
5.4.2.5	Análisis de coexpresión de genes y elementos repetitivos	46
5.4.2.6	Análisis de enriquecimiento en módulos de coexpresión	47
5.4.2.7	Detección de genes y elementos repetitivos centrales (<i>hub</i>)	48
6.	Resultados	49
6.1.	Análisis de muestras de RNA-seq de ajolotes nativos	49
6.1.1.	La expresión diferencial de genes durante la regeneración	49
6.1.2.	La expresión diferencial de genes como efecto del envejecimiento	52
6.1.3.	La expresión diferencial de retrotransposones durante la regeneración	54
6.2.	Análisis global de muestras de RNA-seq de ajolote	60
6.2.1.	La expresión diferencial de genes en el envejecimiento y la regeneración	60
6.2.2.	La expresión diferencial de elementos repetitivos en el envejecimiento y la regeneración	67
6.2.3.	La coexpresión de genes y elementos repetitivos en el envejecimiento y la regeneración	74
7.	Discusión	84
7.1.	Los genes codificantes de proteínas durante la regeneración de la extremidad del ajolote	84
7.2.	La predominante supresión de elementos repetitivos durante la regeneración de la extremidad del ajolote	85
7.2.1.	Los posibles mecanismos de regulación de los retrotransposones durante la regeneración	87
7.3.	Los efectos del envejecimiento sobre la expresión de elementos repetitivos en el ajolote	88
7.4.	Los efectos del envejecimiento sobre las capacidades regenerativas del ajolote	93
7.5.	Limitaciones de este trabajo	94
8.	Conclusiones	97

9. Perspectivas	98
Referencias	99
Apéndices	133
A. Calidad de las muestras de RNA extraídas de tejidos de ajolotes nativos	134
B. Metadatos de las muestras de secuenciación de RNA analizadas en este trabajo . .	135
C. Generación y anotación de una librería de elementos repetitivos del genoma de <i>Ambystoma mexicanum</i>	145
D. Resumen de los genes y elementos repetitivos con el mayor cambio en la regeneración y el envejecimiento	151
E. Publicación de artículos durante la licenciatura	162
E.1. Retrotransposon expression is upregulated by aging and suppressed during regeneration of the limb in the axolotl (<i>Ambystoma mexicanum</i>) (Ruiz-Pérez <i>et al.</i> , 2024 [Prepublicación])	162
E.2. Histones and their chaperones: Adaptive remodelers of an ever-changing chromatinic landscape (Torres-Arciga <i>et al.</i> , 2022)	163
E.3. Equine Hoof Wall Deformation: Novel Aspects Revealed (Lazarus <i>et al.</i> , 2023)	164
E.4. Jackfruit: Composition, structure, and progressive collapsibility in the largest fruit on the Earth for impact resistance (Lazarus <i>et al.</i> , 2023)	165
E.5. Equine hoof wall: Structure, properties, and bioinspired designs (Lazarus <i>et</i> <i>al.</i> , 2022)	166

Índice de figuras

Figura 1.1.	Regeneración a diferentes niveles de organización biológica.	2
Figura 1.2.	Desarrollo del blastema de extremidad en el ajolote.	6
Figura 1.3.	Efectos del envejecimiento en la morfología y anatomía del ajolote mexicano.	15
Figura 1.4.	Efectos del envejecimiento sobre la regeneración anterior en el anélido de agua dulce <i>Aeolosoma viride</i>	16
Figura 1.5.	Clasificación de los elementos repetitivos eucariotas.	18
Figura 1.6.	Estructura y función de los elementos repetitivos eucariotas.	21
Figura 1.7.	El entorno regenerativo es propicio para la actividad de los elementos transponibles (TEs).	26
Figura 1.8.	Hipótesis de Angileri <i>et al.</i> (2022) sobre el rol de los elementos transponibles en la regeneración.	28
Figura 1.9.	La acumulación de transcritos de elementos repetitivos (REs) relacionada con la edad permite predecir la edad del donante en fibroblastos humanos.	31
Figura 5.1.	Diagrama de flujo de los métodos bioinformáticos utilizados para analizar las muestras de RNA-seq en esta tesis.	39
Figura 6.1.	Representación gráfica del muestreo de tejido de ajolotes nativos.	49
Figura 6.2.	Previsualización de la calidad y agrupamiento de los conteos de genes y elementos repetitivos (REs) en ajolotes nativos.	50
Figura 6.3.	Expresión diferencial de genes durante la regeneración y el envejecimiento en ajolotes nativos.	51
Figura 6.4.	Enriquecimiento de vías biológicas durante la regeneración y el envejecimiento en ajolotes nativos.	53
Figura 6.5.	Expresión diferencial de elementos repetitivos (REs) durante la regeneración y el envejecimiento en ajolotes nativos.	55
Figura 6.6.	Agrupamiento de genes y elementos repetitivos (REs) con base en su desviación con respecto a la media y expresión diferencial en muestras de ajolotes nativos.	57
Figura 6.7.	Contexto genómico del gen <i>LOC115082697</i> y el elemento repetitivo <i>rnd-6_family-8458</i> , ambos sobreexpresados en el blastema.	61
Figura 6.8.	Gráfico de análisis de componentes principales (PCA) de los recuentos de genes y elementos repetitivos del análisis de muestras global.	62

Figura 6.9.	Diferencias en la expresión génica entre muestras globales de distintos grupos de edad de ajolotes.	63
Figura 6.10.	Enriquecimiento de vías biológicas durante el envejecimiento en ajolotes. . .	64
Figura 6.11.	Diferencias en la expresión génica entre muestras globales de distintos tejidos de ajolote.	65
Figura 6.12.	Enriquecimiento de vías biológicas durante la regeneración de la extremidad en ajolotes.	66
Figura 6.13.	Diferencias en la expresión de elementos repetitivos (REs) entre muestras globales de distintos grupos de edad de ajolotes.	68
Figura 6.14.	Diferencias en la expresión de elementos repetitivos (REs) entre muestras globales de distintos tejidos de ajolote.	69
Figura 6.15.	Agrupamiento de genes y elementos repetitivos (REs) con base en su desviación con respecto a la media y expresión diferencial en el envejecimiento de muestras globales de ajolotes.	72
Figura 6.16.	Agrupamiento de genes y elementos repetitivos (REs) con base en su desviación con respecto a la media y expresión diferencial en la regeneración de muestras globales de ajolotes.	73
Figura 6.17.	Contexto genómico del gen <i>HIRA</i> y el elemento repetitivo <i>7750_8250_cluster_73</i> (LTR), ambos sobreexpresados en la extremidad de adultos en comparación con la de subadultos.	75
Figura 6.18.	Coexpresión de genes y elementos repetitivos (REs) y su asociación con el envejecimiento y la regeneración en el ajolote.	77
Figura 6.19.	Significancia para el fenotipo (GS) y membresía intramodular (MM) de genes y elementos repetitivos en módulos de coexpresión.	78
Figura 6.20.	Enriquecimiento de vías biológicas en los módulos de coexpresión con mayor correlación con el grupo de edad o tejido regenerativo en ajolotes.	80
Figura 6.21.	Genes y elementos repetitivos (REs) centrales (<i>hubs</i>) en los módulos de coexpresión con mayor correlación con el grupo de edad o tejido regenerativo en ajolotes.	81

Índice de cuadros

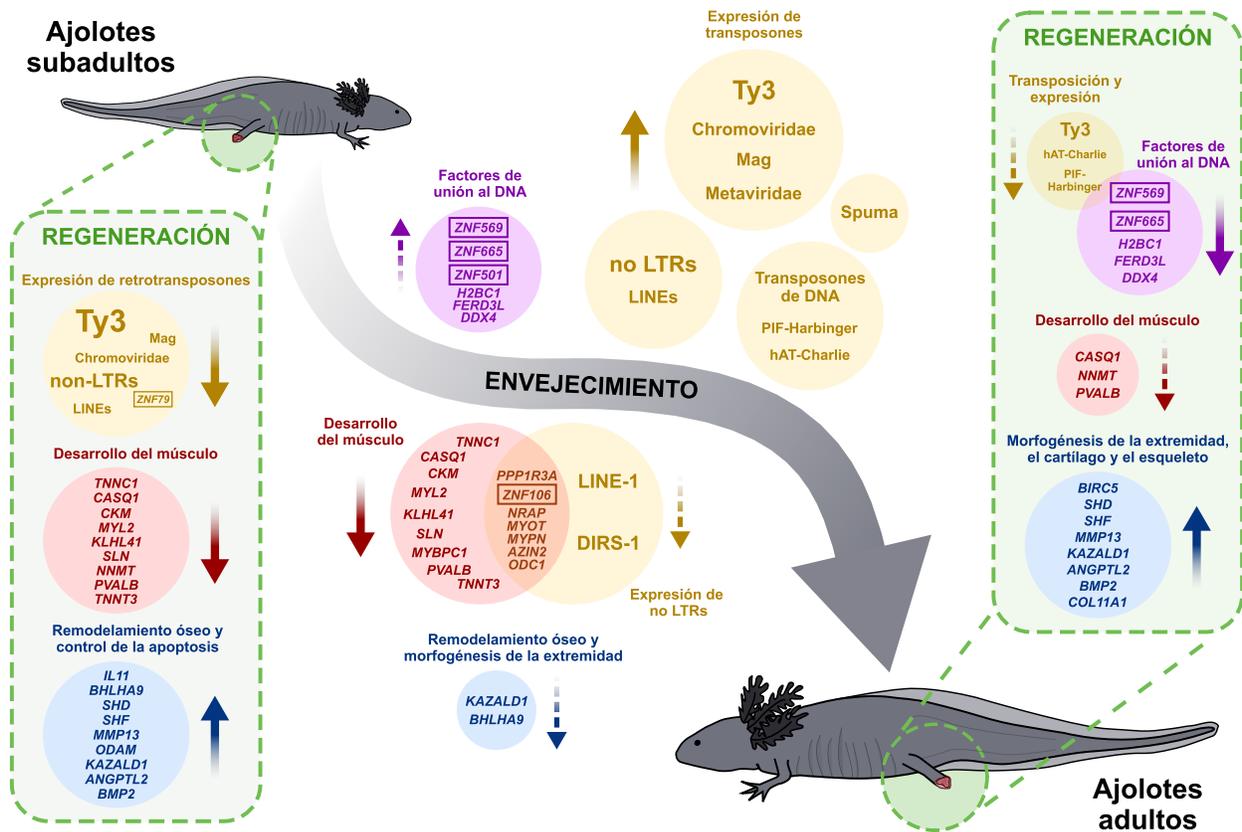
Cuadro 1.1.	Vías de señalización y factores implicados en la regulación de la regeneración de las extremidades del ajolote, su perfil de expresión y funciones sugeridas. Cuadro traducido y adaptado con permiso desde Bölük <i>et al.</i> (2022).	9
Cuadro 6.1.	Resumen de los loci de subfamilias de elementos repetitivos expresados diferencialmente y las características genómicas (regiones intragénicas o intergénicas) con las que se superponen para el contraste entre tejidos de blastema y extremidad en ajolotes nativos.	58
Cuadro 6.2.	Recuento y anotación de las subfamilias de elementos repetitivos expresadas diferencialmente en los contrastes de edad y tejido de muestras de ajolote. . .	70
Cuadro A.1.	Calidad de las muestras de RNA extraídas de tejidos de ajolotes nativos. . . .	134
Cuadro B.1.	Metadatos de las muestras de secuenciación de RNA analizadas en este trabajo.	135
Cuadro C.1.	Lista de paquetes contenidos en versión modificada de Dfam TE Tools Container 1.7.	145
Cuadro C.2.	Comparación de resultados y estadísticas para ejecuciones de RepeatModeler2 con varios genomas de muestra y el genoma del ajolote.	147
Cuadro D.1.	Lista de los genes y elementos repetitivos con la mayor tasa de cambio absoluta significativa para los contrastes del blastema vs. la extremidad y las muestras de adultos vs. subadultos.	151

Resumen

El ajolote (*Ambystoma mexicanum*) tiene una gran capacidad para regenerar sus células, tejidos y partes corporales, sin embargo, la fidelidad y el éxito de su proceso regenerativo disminuyen con la edad. Los retrotransposones constituyen alrededor del 65 % (~18.6 Gb) del genoma del ajolote y su expresión puede estar involucrada en la disminución de las capacidades regenerativas asociada con el envejecimiento. Pese a que el papel de los retrotransposones en la embriogénesis, la diferenciación celular y, en general, la regulación de la expresión génica ha sido ampliamente descrito en diversos modelos animales, el estudio de su función en la regeneración reparativa ha sido opacado por las investigaciones centradas en los genes codificantes de proteínas. En esta tesis, a través de un análisis integrativo de la expresión de elementos repetitivos utilizando RNA-seq, se reporta que los retrotransposones, especialmente del grupo Ty3, están altamente sobreexpresados en el ajolote como efecto del envejecimiento. Otros transposones no LTR, incluido LINE-1, funcionan como centros de redes de coexpresión de genes implicadas en vías del desarrollo muscular, la actividad de N-metiltransferasa, la proteólisis amiloide, la regulación de la apoptosis y el reemplazo del tejido conectivo, todas las cuales son suprimidos en el envejecimiento. Por el contrario, se muestra que durante la regeneración de la extremidad estas vías y la expresión de los retrotransposones Ty3 están claramente reguladas a la baja. Aunque el blastema es capaz de reajustar la mayor parte de la desregulación de los transposones provocada por el envejecimiento, varios elementos repetitivos permanecen afectados y podrían tener un impacto en las respuestas metabólicas e inmunes durante el proceso regenerativo. También se informa que numerosos factores de transcripción C2H2-ZFP, especialmente KRAB-ZPFs, se coexpresan con retrotransposones centrales, lo que revela su potencial como importantes reguladores de la expresión de elementos transponibles durante el envejecimiento y la regeneración. Este análisis proporciona un perfil integral de la expresión de retrotransposones a través del envejecimiento y durante la regeneración de las extremidades en el ajolote, e indica que los elementos transponibles responden a los cambios fisiológicos de una manera específica del tejido y participan en las redes génicas correguladoras que subyacen al proceso regenerativo.

Palabras clave: ajolote, regeneración, envejecimiento, extremidad, blastema, elemento repetitivo, retrotransposón, desarrollo

Resumen gráfico



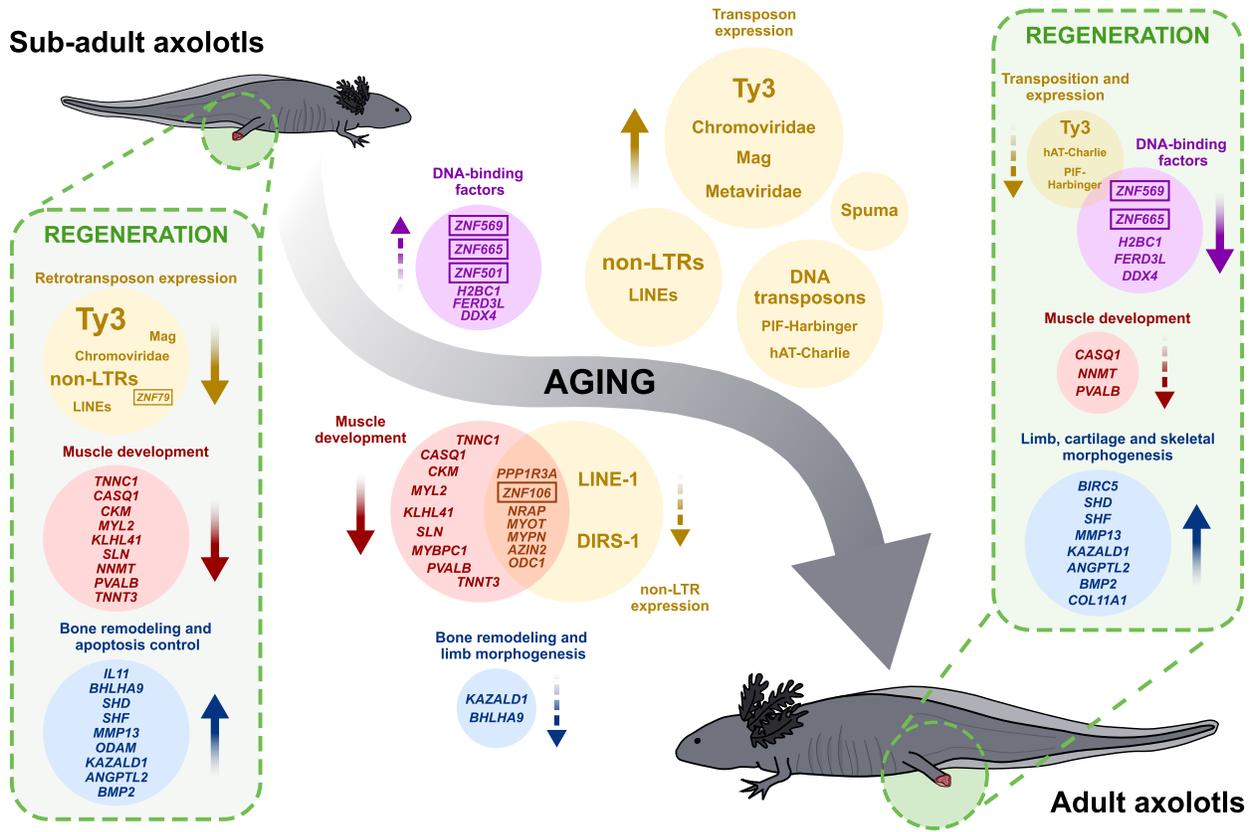
Análisis transcriptómicos de ajolotes adultos y subadultos permiten plantear un papel potencial de los retrotransposones durante la regeneración de las extremidades y cómo se ven afectados por el envejecimiento. Los retrotransposones de la superfamilia Ty3 generalmente se suprimen durante la regeneración, pero después de experimentar una regulación positiva significativa a lo largo del envejecimiento del ajolote, su regulación durante la reparación del tejido se ve limitada. Previamente se ha reportado que el éxito del proceso regenerativo del ajolote disminuye con la edad. Los hallazgos presentados aquí muestran que Ty3 y otras familias de transposones, como LINE-1, están involucradas en las redes reguladoras de genes que suprimen el desarrollo muscular, el control de la apoptosis y el reemplazo de tejidos debido al envejecimiento. Estos resultados sugieren que la expresión de elementos repetitivos puede limitar indirectamente las capacidades regenerativas de los ajolotes más viejos.

Abstract

The axolotl (*Ambystoma mexicanum*) has a great capacity to regenerate its tissues and whole-body parts, however, the fidelity and success of its regenerative process diminish with age. Retrotransposons make up the largest portion of the axolotl genome (65 % or ~18.6 Gb), and their expression may be involved in this age-related decline. Although the role of retrotransposons in embryogenesis, cell differentiation and, in general, the regulation of gene expression, has been widely described in various animal models, the study of their function in reparative regeneration has been overshadowed by the research focused on protein-coding genes. In this thesis, through an integrative analysis of repetitive element expression using RNA-seq, it is reported that retrotransposons, especially of the Ty3 group, are highly overexpressed in the axolotl as an effect of aging. Other non-LTR transposons, including LINE-1, function as hubs of gene coexpression networks involved in muscle development, N-methyltransferase activity, amyloid proteolysis, and regulation of apoptosis and connective tissue replacement, which are also suppressed by aging. In contrast, it is shown that during regeneration of the limb these pathways and the expression of Ty3 retrotransposons are distinctly downregulated. Even though the blastema is able to readjust most of the transposon dysregulation caused by aging, several elements remain affected and may have an impact in the metabolic and immune responses during the regenerative process. It is also reported that numerous C2H2-ZFPs, especially KRAB-ZFPs, are coexpressed with hub retrotransposons, which reveals their potential as important regulators of transposable element expression during aging and regeneration. This integrative analysis provides a comprehensive profile of retrotransposon expression through aging and during limb regeneration in the axolotl and indicates that transposable elements are responsive to physiological changes in a tissue-specific way and participate in the gene co-regulatory networks underlying the regenerative process.

Keywords: axolotl, regeneration, aging, limb, blastema, repetitive element, retrotransposon, development

Graphical abstract



Transcriptomic analyses of adult and sub-adult axolotls offer an insight into the potential role of retrotransposons during limb regeneration and how they are affected by aging. Retrotransposons of the Ty3 superfamily are usually suppressed during regeneration, but after experiencing a significant upregulation through the aging of the axolotl, their regulation during tissue repair is limited. It has previously been reported that the success of the axolotl's regenerative process diminishes with age. The findings presented here show that Ty3 and other transposon families, such as LINE-1, are involved in the gene regulatory networks that suppress muscle development, apoptosis control, and tissue replacement due to aging. These results suggest that repetitive element expression may indirectly constrain the regenerative capacities of older axolotls.

1. Introducción

1.1. La regeneración animal

La regeneración es un fenómeno generalizado pero altamente variable entre los animales, lo que la ha convertido en un tema de continuo interés científico. En el caso de los animales, consiste en la restauración de una estructura corporal perdida, que puede desencadenarse por una variedad de estímulos, puede ocurrir en diferentes partes del ciclo de vida y puede proceder a través de una diversidad de procesos de desarrollo (Bely y Nyberg, 2010). Además, puede producir estructuras de fidelidad variable en relación con el original y puede ocurrir a múltiples niveles de organización (**Figura 1.1**), incluyendo estructuras subcelulares, células, tejidos, órganos u organismos completos (Bely y Nyberg, 2010; Elchaninov *et al.*, 2021). A diferencia de la regeneración fisiológica, que ocurre durante el ciclo de vida normal o en el desempeño de las funciones del organismo, la regeneración reparativa es inducida por lesiones (Vorontsova y Liosner, 1960; Elchaninov *et al.*, 2021).

La capacidad y los mecanismos para reparar heridas son propiedades conservadas por todos los organismos; sin embargo, la capacidad de regenerar estructuras más complejas, como las extremidades, es muy variable entre las especies de tetrápodos (Vieira *et al.*, 2020). Además, se cree que todos los tetrápodos tienen la capacidad de regenerar estructuras complejas como órganos o extremidades como embriones, pero muchas de estas especies, incluidos los mamíferos, pierden esta capacidad a medida que se desarrollan hasta convertirse en organismos adultos, mientras que otros, incluidos los anfibios urodelos (salamandras y tritones), generalmente son capaces de regenerarse durante toda la edad adulta (Vieira *et al.*, 2020).

Los mecanismos de regeneración se pueden clasificar en términos generales en dos categorías distintas: morfálaxis y epimorfosis (Morgan, 1901; Londono *et al.*, 2018). La morfálaxis implica la reorganización completa de los tejidos que restan tras una lesión para dar lugar a un organismo más pequeño pero completo (Agata *et al.*, 2007; Bosch, 2007; Londono *et al.*, 2018). La epimorfosis, por

otro lado, se refiere a la regeneración del tejido faltante mediante la proliferación celular en el sitio de la lesión sin afectar la estructura del resto del organismo. Este tipo de regeneración se basa en la formación de un blastema, una masa de células indiferenciadas en el lugar de la lesión capaz de dar lugar a tejidos diferenciados de la estructura regenerada (**Figura 1.1**) (E. a. B. Gilbert *et al.*, 2015; McCusker *et al.*, 2015; Simkin *et al.*, 2015; Londono *et al.*, 2018).

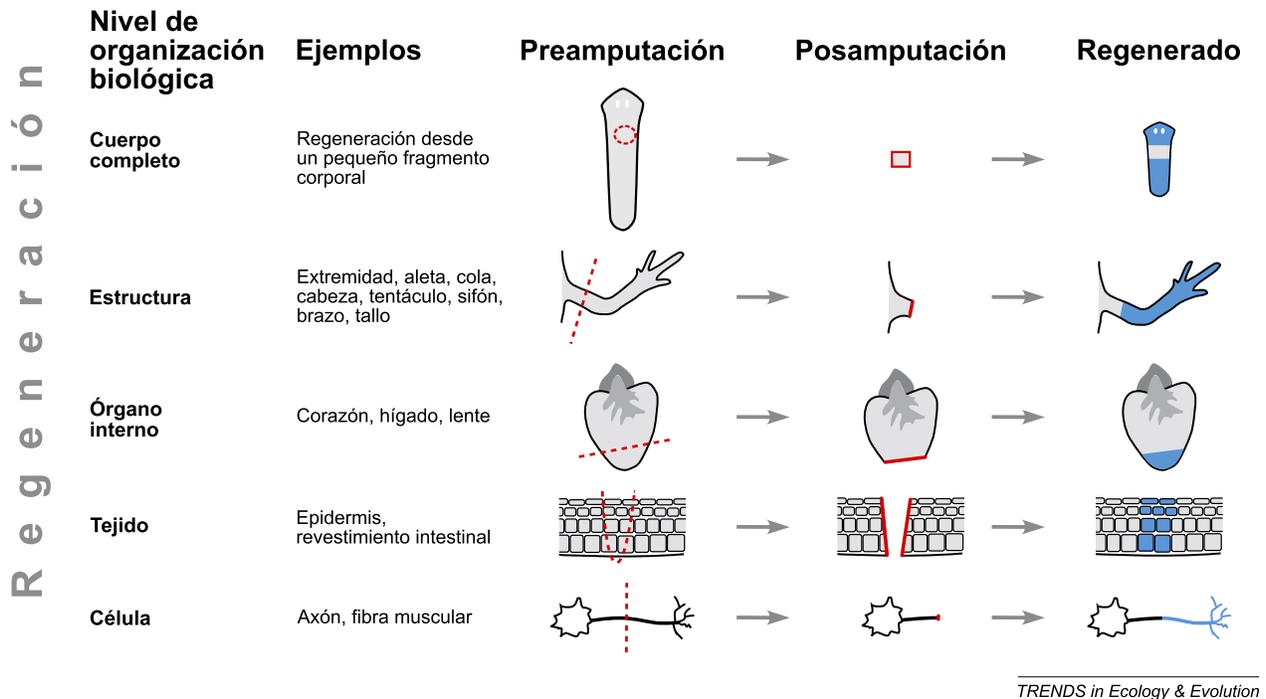


Figura 1.1. Regeneración a diferentes niveles de organización biológica. Una especie particular podría regenerar a todos, a ninguno o a solo un subconjunto de estos niveles. La «regeneración» a nivel de colonia, como se observa en animales coloniales como corales y ascidias, ocurre mediante reproducción asexual y no mediante regeneración de individuos y, por lo tanto, no se incluye aquí. Las líneas rojas discontinuas indican planos de amputación; las líneas rojas continuas indican superficies de heridas; y el relleno azul indica partes del cuerpo regeneradas. Figura traducida y adaptada con permiso desde Bely y Nyberg (2010).

Algunos animales, como los platelmintos, la hidras, las estrellas de mar, entre otros, son especies con un potencial regenerativo excepcional tanto para tejidos como partes corporales y, por lo tanto, se utilizan comúnmente como modelos de estudio de la regeneración en invertebrados (Cary *et al.*, 2019; Cloutier *et al.*, 2021; Murad *et al.*, 2021; Bölük *et al.*, 2022). Aunque estos animales son modelos excelentes para estudiar las bases de la regeneración, la distancia evolutiva de los invertebrados a los mamíferos limita la aplicabilidad de los resultados obtenidos en estos animales al sistema mamífero. Esto resalta la necesidad de utilizar modelos vertebrados en la investigación de

la regeneración. La presencia de genes altamente conservados y vías comunes entre los mamíferos, los anfibios y los osteíctios, por ejemplo, posiciona a estos grupos como importantes modelos de la regeneración en vertebrados (Bölük *et al.*, 2022). Entre estos, los ajolotes destacan como uno de los grupos más estudiados en el contexto de la biología regenerativa en los últimos años.

1.2. El ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*)

El ajolote mexicano o *Ambystoma mexicanum* (Shaw y Nodder, 1789) es una salamandra ampliamente estudiada debido a su gran capacidad para regenerar células, tejidos, y partes corporales. Es nativo del Valle de México y actualmente habita los canales de Xochimilco y los lagos de Chalco y Chapultepec, con una extensión de ocurrencia de 467 km² (Contreras *et al.*, 2009; Recuero *et al.*, 2010; IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2019). Su esperanza de vida es de entre 5 y 7 años en la naturaleza y de entre 10 y 25 años en cautiverio (Farkas y Monaghan, 2015; Vieira *et al.*, 2020). Desafortunadamente, las especies del género *Ambystoma* se encuentran entre los grupos más amenazados en el país: 17 de 18 especies son endémicas y tienen rangos geográficos relativamente pequeños (Frías-Alvarez *et al.*, 2010; Parra-Olea *et al.*, 2014; SEMARNAT, 2019; Frost, 2020; Paz *et al.*, 2020). Además, según la última evaluación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), publicada el 23 de octubre de 2019, el ajolote mexicano está clasificado como en peligro crítico (CR) debido a una disminución de la población estimada en más del 80 % en las últimas tres generaciones (16.5 años), resultado de los impactos combinados de la urbanización, la contaminación de las vías fluviales, y la depredación y competencia de especies invasoras (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2019). En un estudio que abarcó un lapso de seis años (de 1998 a 2004), la densidad de la especie se redujo de 6000 individuos/km² a 1000 individuos/km², aunque se piensa que esta reducción también podría haberse debido a su propia dinámica poblacional (Zambrano González *et al.*, 2003; Zambrano, 2006). Sin embargo, las estimaciones de densidad de población más recientes para esta especie muestran disminuciones alarmantes: de 100 individuos/km² en 2008 (Contreras *et al.*, 2009) a 36 individuos/km² en 2014 (citado en DGCS UNAM, 2022). Paradójicamente, los ajolotes son fáciles de mantener y criar en cautiverio y millones se utilizan como mascotas y animales

de investigación en todo el mundo (Reiß *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2021). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones con *A. mexicanum* a nivel internacional están enfocadas en la biología del desarrollo y la regeneración. A pesar de los continuos esfuerzos de restauración ecológica durante los últimos años, las poblaciones de ajolotes y otras especies nativas fuera de los refugios artificiales no han sido exitosas (Zambrano *et al.*, 2020).

1.2.1. La regeneración de las extremidades en el ajolote mexicano

La mayoría de los estudios de laboratorio con el ajolote se han centrado en la regeneración de las extremidades y, en menor medida, de la cola, pero muchas otras partes del cuerpo son capaces de una regeneración fiel (McCusker *et al.*, 2015). De hecho, en comparación con otros tetrápodos, los ajolotes tienen una capacidad distintiva para regenerar las extremidades (Roy y Lévesque, 2006), la mandíbula (Makanae *et al.*, 2020), la columna (Demircan *et al.*, 2020), el cerebro (Amamoto *et al.*, 2016), el corazón (Pedersen *et al.*, 2021), las branquias (Saito *et al.*, 2019), entre otros (Bölük *et al.*, 2022). Aunque otros vertebrados pueden reemplazar las partes faltantes tras una lesión, en muchos casos sus nuevas estructuras no son iguales a las originales. Por ejemplo, cuando las lagartijas regeneran su cola, la nueva estructura cumple la misma función que la original pero se desarrolla mediante mecanismos diferentes y su estructura es una versión simplificada de la original; es decir, difiere en varios aspectos notables, incluida la composición tisular y la organización del esqueleto, el sistema muscular y la médula espinal (S. V. Bryant y Bellairs, 1967; E. A. B. Gilbert *et al.*, 2013; McCusker *et al.*, 2015).

La regeneración epimórfica característica de vertebrados consta de múltiples pasos complejos y superpuestos que comienzan con las primeras etapas de la respuesta de curación de la lesión y culminan con la regeneración de una réplica idéntica o casi idéntica del tejido original sin formar cicatrices (Morgan, 1901; Londono *et al.*, 2018). En el caso de las salamandras, el tiempo que tardan en completar una epimorfosis puede variar por la edad, tamaño o metabolismo del organismo. En general, las larvas acuáticas de salamandras más pequeñas se regeneran más rápido que las salamandras terrestres: un ajolote juvenil puede regenerar una extremidad en aproximadamente

40-50 días, sin embargo, las formas terrestres tardan mucho más (Voss *et al.*, 2022). Por ejemplo, Young *et al.* (1983) reportaron que diferentes especies de ambistomátidos terrestres muestran un gran rango de variación en la tasa de regeneración: *Ambystoma tigrinum* regenera una extremidad en 155-180 días; *A. texanum* en 215-250 días; *A. maculatum* en 255-300 días; y *A. annulatum* lo hace en 324-375 días. Recientemente, K. M. Wells *et al.* (2021) indicaron que *A. mexicanum* de 10 cm de largo tardaron hasta 140 días en regenerar completamente. Fue hasta este día que el tamaño de la extremidad regenerada ya no era significativamente distinto con respecto a las extremidades ilesas en animales del mismo largo y con la misma tasa de crecimiento. Evidentemente, no solo la edad y el tamaño corporal influyen en la tasa de regeneración, sino que diferentes especies del mismo género también se regeneran a diferentes ritmos. También es plausible que los individuos dentro de una especie muestren variación en las distintas etapas del proceso regenerativo.

En el caso específico de la regeneración de las extremidades en el ajolote, la formación de blastema requiere una inervación adecuada (Singer, 1974), un epitelio de herida permisivo como el del desarrollo de las extremidades (Wallace, 1981) y células de origen conectivo que codifiquen diferentes identidades posicionales (French *et al.*, 1976; S. V. Bryant *et al.*, 1981; McCusker *et al.*, 2015) (**Figura 1.2a**). Con base en la morfogénesis del miembro anterior en ajolotes adultos, Tank *et al.* (1976) propusieron un sistema de siete etapas claramente diferenciadas durante el proceso regenerativo: (a) curación de la lesión; (b) desdiferenciación; (c) brote temprano (EB); (d) brote intermedio (MB); (e) brote tardío (LB); (f) fase de paleta; y (g) crecimiento digital (Bölük *et al.*, 2022).

En pocas palabras, la regeneración es un proceso gradual que comienza con la formación del epitelio de la herida y termina con una reparación completa (Endo *et al.*, 2004). Cada etapa está estrictamente regulada y es necesaria para pasar a la siguiente fase de la regeneración (Bölük *et al.*, 2022). Para formar el epitelio de la herida, el sitio de la lesión primero se cubre rápidamente por células epidérmicas. Posteriormente, con suficiente estimulación nerviosa, el epitelio se espesa, y después se desarrolla el casquete epitelial apical (AEC) (Satoh *et al.*, 2008; Ferris *et al.*, 2010; Satoh *et al.*, 2012). Tras la formación del AEC, se inicia el desarrollo temprano de la yema (o brote)

mediante la producción de señales de reclutamiento celular presentes en y alrededor del sitio de la herida para formar la yema temprana (Makanae y Satoh, 2012). El blastema está compuesto por células progenitoras activadas y es la estructura esencial que organiza la regeneración (Zhu, Pao *et al.*, 2012). Este conjunto de células desdiferenciadas está formado por tipos celulares heterogéneos como fibroblastos, células satélite musculares, pericitos y células hematopoyéticas (Figura 1.2b) (Fei *et al.*, 2017; Leigh *et al.*, 2018).

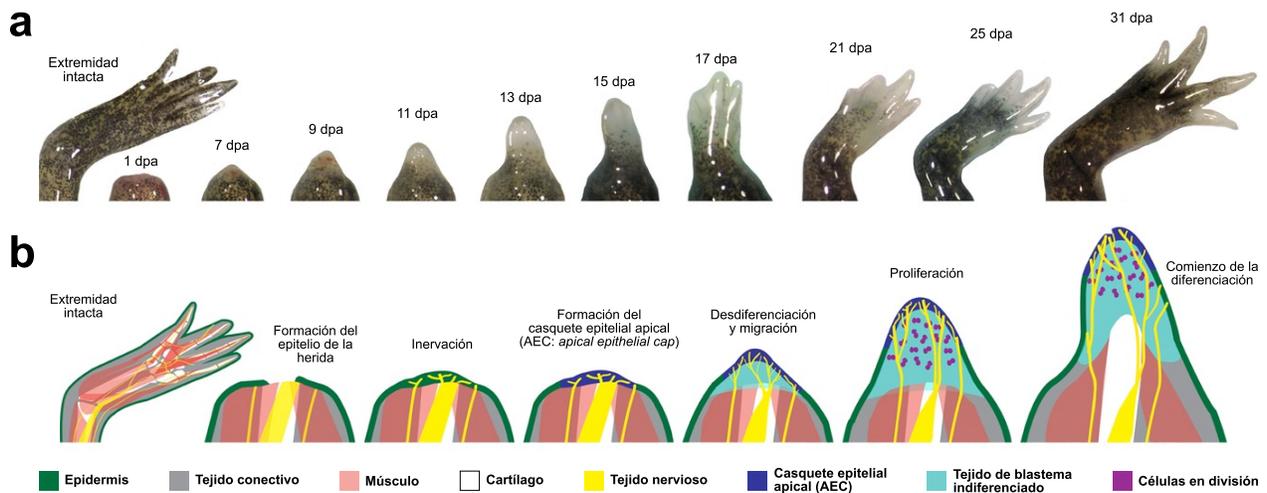


Figura 1.2. Desarrollo del blastema de extremidad en el ajolote. (a) Imágenes en vivo del curso de desarrollo del blastema de una extremidad en *Ambystoma mexicanum*. Se muestran una extremidad intacta (izquierda) y el tejido de 1 a 31 días después de la amputación (consecutivamente hacia la derecha). (b) Pasos clave en el desarrollo del blastema. La extremidad intacta está compuesta de múltiples tejidos, incluidos epidermis, tejido conectivo, cartílago, músculos y nervios, que se organizan de una específicamente para generar estructuras funcionales (izquierda). A las pocas horas posamputación, un epitelio de la herida cubre el borde amputado de la extremidad. En cuestión de días, este epitelio queda innervado y se convierte en un centro de señalización especializado conocido como casquete epitelial apical (AEC). El AEC induce una desdiferenciación en el tejido del muñón subyacente y atrae células que se acumulan debajo del AEC. Posteriormente, las células de la región basal del blastema (más cercana al muñón) comienzan a diferenciarse, mientras que las células de la punta apical del blastema permanecen en un estado proliferativo e indiferenciado (derecha). Con el tiempo, las células del blastema se diferencian progresivamente en tejidos de las extremidades desde las regiones basales hasta las apicales del blastema. Figura traducida y adaptada desde McCusker *et al.* (2015).

En términos moleculares, la regeneración de la extremidad es coordinada por muchas vías y factores de señalización (Bölük *et al.*, 2022); los principales se resumen en el Cuadro 1.1. Con base en los reportes de que la innervación es esencial durante el proceso regenerativo, se ha propuesto que los nervios proporcionan factores neurotróficos (NTFs) necesarios para la formación y el mantenimiento del blastema (Singer, 1978). En contraste, estudios recientes han descubierto varios factores que pueden iniciar la inducción del blastema incluso en extremidades desnervadas, de

los cuales los factores más notables son los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). En específico, estudios han demostrado que las proteínas FGF8 y BMP7 se transmiten desde los ganglios de la raíz dorsal y se liberan a los muñones de las extremidades (Sato *et al.*, 2016). Por sí solos, estos factores no tienen potencial para inducir la formación del blastema (Sato *et al.*, 2011, 2016), pero si *BMP2* o *BMP7* se expresan junto con *FGF2* y *FGF8* en un miembro desnervado, es posible inducir su generación (Makanae *et al.*, 2014). De manera similar, la combinación de FGF2, FGF8, y BMP14, puede inducir la formación del tejido regenerativo, a pesar de que BMP14 no es un factor nervioso (Makanae *et al.*, 2013). Por otro lado, la señalización de las BMPs y FGFs también desempeña un papel en el establecimiento de un patrón esquelético normal en la extremidad. La vía de las BMPs es necesaria para el patrón esquelético anteroposterior y proximodistal (Guimond *et al.*, 2010) y la actividad de las FGFs, junto con la señalización de sonic hedgehog (SHH), regula el patrón anteroposterior (Roy y Gardiner, 2002; Stopper y Wagner, 2007; Nacu *et al.*, 2016).

Otros factores cruciales en el establecimiento y mantenimiento del blastema son el ácido retinoico (RA), los genes homeobox (Hox), las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Bölük *et al.*, 2022). La vía del ácido retinoico está involucrada en el establecimiento de patrones posicionales diferenciales durante la regeneración (Kim y Stocum, 1986a, 1986b; Ludolph *et al.*, 1990; Vieira *et al.*, 2019). Por su parte, diversos genes Hox son expresados tanto durante el desarrollo como durante la regeneración de las extremidades (Torok *et al.*, 1998; M. R. J. Carlson *et al.*, 2001). Por ejemplo, se ha descubierto que el transcrito largo *Hoxc10L* solo se expresa en extremidades en regeneración, pero no en extremidades en desarrollo, lo que sugiere que podría ser un factor específico de la regeneración (M. R. J. Carlson *et al.*, 2001).

Un aspecto importante del proceso regenerativo en el ajolote es que en este no se observa formación de cicatrices después de las amputaciones o lesiones (Lévesque *et al.*, 2010). A diferencia de los ajolotes, los tejidos complejos de los mamíferos adultos se curan mediante la formación de tejido cicatricial en el lugar de la lesión (Bölük *et al.*, 2022). Sin embargo, los procesos de regeneración y cicatrización de heridas comparten muchas similitudes, como la remodelación de

la matriz extracelular (ECM), que implica la expresión de metaloproteinasas de matriz (*MMPs*) (E. V. Yang *et al.*, 1999). En particular, la actividad de las *MMPs* en entornos *in vitro* puede inducir la activación de *PRRX1*, un gen marcador de blastema miembro de la familia homeobox (Satoh *et al.*, 2011). También se ha reportado que la inhibición de la actividad de las *MMPs* reprime la expresión de *PRRX1* y culmina en una falla de la regeneración o una regeneración anormal de las extremidades tanto en el ajolote como en los tritones (Vinarsky *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2011). Estos hallazgos sugieren que la reconstrucción de la ECM es una parte integral de la regeneración y participa en la formación y mantenimiento del blastema (Bölük *et al.*, 2022). Por otro lado, muchos eventos durante la cicatrización de heridas también se rigen por las vías de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). La señalización del TGF- β media la transición epitelial a mesenquimal y el cierre de heridas durante la regeneración de las extremidades del ajolote. Además, la inhibición de la señalización de TGF- β dificulta el crecimiento y la regeneración del blastema (Lévesque *et al.*, 2007; Sader *et al.*, 2019).

Otros factores esenciales que influyen en la regeneración de las extremidades son la vía de señalización Wnt/ β -catenina, p53 y las desacetilasas de histonas (HDACs). En los ajolotes, la inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina da como resultado una regeneración irregular de las extremidades (Kawakami *et al.*, 2006). Por el contrario, la activación química de esta vía en las primeras etapas de la regeneración conduce a la pérdida de inervación y a una cicatrización desorganizada de las heridas, mientras que en las etapas posteriores, después de la formación del blastema pero antes de la morfogénesis, conduce a anomalías esqueléticas (Wischin *et al.*, 2017a, 2017b). Estos hallazgos sugieren que la vía de señalización Wnt/ β -catenina tiene funciones importantes durante la regeneración, como la regulación de la inervación y la morfogénesis esquelética (Bölük *et al.*, 2022). Por su parte, la proteína tumoral p53 (TP53), encargada principalmente de la respuesta al daño del DNA y la regulación negativa de la proliferación celular, está subexpresada durante la formación del blastema, y solo regresa a sus niveles normales tras la rediferenciación (Yun *et al.*, 2013). En lo que se refiere a las HDACs, estas también han sido definidas como factores mediados por el tejido nervioso, pues su expresión se ve reducida por la denervación del tejido en

regeneración (M.-H. Wang *et al.*, 2019). En particular, M.-H. Wang *et al.* (2019) reportaron una regulación positiva rápida y significativa de HDAC1, HDAC4 y HDAC6 en el muñón en regeneración, que alcanza su punto máximo alrededor de las 12 a 24 horas después de la amputación (hpa). Una segunda ola de regulación positiva, más evidente en HDAC1, comienza a partir de las 120 hpa y se vuelve significativa a las 168 hpa, correspondiente a la etapa de yema intermedia. Curiosamente, la denervación de las extremidades del ajolote suprime esta regulación positiva de HDAC1 e inhibe la regeneración de las extremidades. Sin embargo, la suplementación de tres factores nerviosos, BMP7, FGF2 y FGF8, en los muñones rescata parcialmente el fenotipo regenerativo. En general, la inhibición de HDACs genera una reducción de la proliferación celular y un retraso y disminución de la regeneración de las extremidades (M.-H. Wang *et al.*, 2019). A pesar del conocido papel de HDAC1 en la represión de la transcripción mediante la desacetilación de histonas y el ensamblaje de heterocromatina (Gallinari *et al.*, 2007), su función represiva en la regeneración de las extremidades del ajolote se desconoce. Sin embargo, se ha sugerido que algunos factores neurotróficos podrían reprimir DNMT3a para posteriormente regular positivamente la expresión de SP9 y FGF8 y así activar HDAC1 para la regeneración (Min y Whited, 2023).

Cuadro 1.1. Vías de señalización y factores implicados en la regulación de la regeneración de las extremidades del ajolote, su perfil de expresión y funciones sugeridas. Cuadro traducido y adaptado con permiso desde Bölük *et al.* (2022).

Nombre del gen o la vía de señalización	Símbolo del gen/factor	Perfil de expresión durante la regeneración	Rol sugerido	Referencias
Factor de crecimiento de fibroblastos 2	<i>FGF2</i>	No descrito	Como factor de desarrollo nervioso apoya la formación del blastema. Regula el patrón anteroposterior de las extremidades en regeneración.	Nacu <i>et al.</i> (2016), Satoh <i>et al.</i> (2016) y Vieira <i>et al.</i> (2019)
Factor de crecimiento de fibroblastos 8	<i>FGF8</i>	Capa basal del casquete epitelial apical (AEC) y blastema subyacente: ↑	Apoya la formación de blastema como factor de desarrollo nervioso. Regula el patrón anteroposterior de las extremidades en regeneración.	M.-J. Han <i>et al.</i> (2001), Makaanae <i>et al.</i> (2014), Nacu <i>et al.</i> (2016) y Vieira <i>et al.</i> (2019)

Continúa en la siguiente página...

1. Introducción

Cuadro 1.1 – continúa desde la página anterior

Nombre del gen o la vía de señalización	Símbolo del gen/factor	Perfil de expresión durante la regeneración	Rol sugerido	Referencias
Proteína morfogenética ósea 2	<i>BMP2</i>	Desde la etapa inicial de yema hasta la formación de los dedos: ↑	Regula la condensación celular y la apoptosis. Funciona como de desarrollo nervioso. Apoya la formación de blastema.	Guimond <i>et al.</i> (2010), Makanae <i>et al.</i> (2014), Satoh <i>et al.</i> (2016), Vieira <i>et al.</i> (2019) y Vincent <i>et al.</i> (2020)
Proteína morfogenética ósea 7	<i>BMP7</i>	No descrito	Funciona como de desarrollo nervioso. Apoya la formación de blastema.	Makanae <i>et al.</i> (2014) y Vieira <i>et al.</i> (2019)
Factor de diferenciación de crecimiento 5	<i>GDF5</i> (<i>BMP14</i>)	No descrito	Induce una estructura similar a un blastema. Junto con FGF2 y FGF8 puede inducir un blastema.	Makanae <i>et al.</i> (2013)
Factor de crecimiento transformante beta 1	<i>TGFB1</i>	Fase de preparación temprana: ↑ Fase de redesarrollo tardía: ↓	Transición epitelial a mesenquimatosas. Cierre de herida	Lévesque <i>et al.</i> (2007)
Metalopeptidasa de la matriz 9	<i>MMP9</i>	Expresión bifásica. Fase temprana de cicatrización de heridas y activación tardía de células progenitoras hasta etapa de yema tardía: ↑	Promueve la expresión del gen del blastema <i>PRRX1</i> . Reconstrucción de la matrix extracelular (ECM) durante la regeneración.	E. V. Yang <i>et al.</i> (1999) y Satoh <i>et al.</i> (2011)
Vía de señalización Wnt	WNT/ β -catenin	Expresión de Wnt5a desde la activación tardía de las células progenitoras hasta la etapa temprana de los dígitos: ↑ Expresión WNT5B en el blastema: ↑ Expresión de WNT7A desde la etapa de yema media hasta la etapa de formación de dígitos: ↑	Posiblemente regula la innervación y la morfogénesis de los elementos esqueléticos.	Kawakami <i>et al.</i> (2006), Ghosh <i>et al.</i> (2008), Shimokawa <i>et al.</i> (2013) y Wischin <i>et al.</i> (2017a, 2017b)
Molécula de señalización Sonic hedgehog	<i>SHH</i>	Desde la etapa del brote intermedio hasta la etapa de paleta: ↑	Patrón anteroposterior de las extremidades del ajolote en regeneración.	Torok <i>et al.</i> (1999) y Nacu <i>et al.</i> (2016)

Continúa en la siguiente página...

1. Introducción

Cuadro 1.1 – continúa desde la página anterior

Nombre del gen o la vía de señalización	Símbolo del gen/factor	Perfil de expresión durante la regeneración	Rol sugerido	Referencias
Neuregulina 1	<i>NRG1</i>	En epitelio de la herida y blastema: ↑	Otro factor asociado a los nervios. Puede rescatar extremidades de-nervadas cuando se expresa sola.	Freitas <i>et al.</i> (2019)
Proteína tumoral p53	<i>TP53</i>	Durante la formación del blastema: ↓ Durante la rediferenciación: ↑	Regula estrechamente el estado diferenciado de las células de blastema.	Yun <i>et al.</i> (2013)
Histona desacetilasa 1	<i>HDAC1</i>	Expresión bifásica. Fase temprana y etapa de formación del blastema: ↑	Estimular la proliferación celular y la formación de blastema.	M.-H. Wang <i>et al.</i> (2019)
Trombospondina 4	<i>TSP4</i>	Durante la formación del blastema: ↑ En tendones y pericondrio en desarrollo: ↑	Posiblemente regula la regeneración de elementos esqueléticos ya que los cambios en su nivel de expresión condujeron a malformaciones esqueléticas.	Whited <i>et al.</i> (2011, 2012)
Trombospondina 1	<i>TSP1</i>	Epidermis de la herida: ↑	Regulación del espesor del colágeno subepidérmico y el número de células mieloides dentro del blastema en desarrollo.	Whited <i>et al.</i> (2011) y Kuo <i>et al.</i> (2015)
Factor de transcripción 2 de la caja SRY	<i>SOX2</i>	No descrito	Crucial para la proliferación de células madre neurales y la regeneración de la médula espinal	Fei <i>et al.</i> (2014)
Vía del ácido retinoico	RA	No descrito	Proporciona la disparidad posicional necesaria para la formación de patrones.	Kim y Stocum (1986a), Ludolph <i>et al.</i> (1990), Vieira <i>et al.</i> (2019) y Polvadore y Maden (2021)
Eyes absent 2 (Ojos ausentes 2)	<i>EYA2</i>	Epidermis de la herida y blastema: ↑	Regulación de la respuesta al daño del DNA durante la regeneración.	Sousounis <i>et al.</i> (2020)

↑: regulado al alza; ↓: regulado a la baja.

1.2.2. La disminución de las capacidades regenerativas como efecto del envejecimiento

Además de sus asombrosas capacidades regenerativas, los ajolotes también muestran resistencia a algunas patologías relacionadas con la edad y al cáncer, incluso cuando se les estimula con carcinógenos (Waddington, 1935; Tsonis y Eguchi, 1981; Tsonis, 1983). La regeneración es un proceso de múltiples pasos equilibrados y coordinados, y entre los mecanismos que subyacen al proceso regenerativo, muchos también están involucrados en el cáncer, por ejemplo, la iniciación y el mantenimiento de señales proliferativas, la desregulación del ciclo celular y la elevada división celular (Bölük *et al.*, 2022). Recientemente se ha reportado que la modulación del ciclo celular y la reprogramación celular son necesarias para la correcta regeneración de las extremidades del ajolote (Espinal-Centeno *et al.*, 2020). A pesar de sus similitudes, es precisamente este control estricto y oportuno de los reguladores centrales del ciclo celular en el ajolote lo que diferencia al proceso regenerativo de las células cancerosas, en las que los pasos reguladores del ciclo celular apenas se mantienen (Bölük *et al.*, 2022).

Entre los reguladores centrales del ciclo celular, se encuentran las vías de Notch, hedgehog, Wnt, receptores tirosina quinasa (RTKs) y TGF- β . Estos factores están activos durante la regeneración y en la regulación de la transición epitelial-mesenquimatoso, sin embargo, una vez completada la regeneración, sus señales proliferativas deben apagarse, o de lo contrario, pueden desembocar en una reparación anormal de los tejidos, fibrosis y el crecimiento celular descontrolados o la formación de tumores (Oviedo y Beane, 2009). De hecho, a pesar de su resistencia al cáncer, se han reportado algunos casos asociados con carcinomas en ajolotes, incluyendo melanoforomas en muestras de la piel de dos ajolotes (Khudoley y Mizgireuv, 1980), mastocitomas cutáneos en 18 ajolotes de entre 11 y 17 años (Harshbarger *et al.*, 1999), y neuroblastomas olfatorios (Shioda *et al.*, 2011; Modesto *et al.*, 2022).

Adicionalmente, las salamandras exhiben una resistencia poco común al envejecimiento (Yun, 2021). Aunque este tema ha sido abordado por pocos estudios y aún se desconoce la base subyacente

a su excepcional longevidad, la evidencia de registros en cautiverio en zoológicos y laboratorios sugieren que varias especies de urodelos no muestran los signos tradicionales de deterioro fisiológico que acompañan al envejecimiento en otros animales como los mamíferos y, por lo tanto, se consideran organismos de «senescencia despreciable» (Finch, 1994; Margotta *et al.*, 2002; Cayuela *et al.*, 2019; Yun, 2021).

En los últimos años, la senescencia celular se ha identificado como un factor impulsor de varios trastornos relacionados con la edad. Las células senescentes son inducidas por diversas formas de estrés celular, como el daño al DNA, el acortamiento de los telómeros, el estrés oxidativo y la activación de oncogenes (Gorgoulis *et al.*, 2019). En respuesta a estos estímulos, las células sufren una detención permanente del ciclo celular y adquieren un fenotipo característico que incluye la capacidad de secretar un repertorio de factores de crecimiento, proteínas remodeladoras de la matriz y moduladores de la inflamación y la inmunidad (Walters y Yun, 2020).

Las células senescentes desempeñan funciones fisiológicas en varios contextos, incluido el desarrollo (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013; Davaapil *et al.*, 2017), la cicatrización de heridas (Jun y Lau, 2010; Demaria *et al.*, 2014; Ritschka *et al.*, 2017) y los procesos de reparación de tejidos (Yun *et al.*, 2015; Sarig *et al.*, 2019; Da Silva-Álvarez *et al.*, 2020), tanto en mamíferos como en salamandras. Sin embargo, en ratones y humanos, estas células se acumulan en diversos tejidos a medida que el organismo envejece, lo que resulta en un desequilibrio en la respuesta inflamatoria y la promoción de trastornos relacionados con la edad como sarcopenia, aterosclerosis, pérdida de grasa subcutánea, osteoartritis y neurodegeneración (van Deursen, 2014; Gorgoulis *et al.*, 2019). Por el contrario, se ha reportado que los tritones de hasta 10 años y los ajolotes de hasta 20 años no acumulan células senescentes en sus tejidos, incluyendo el hígado, bazo, corazón y extremidades, a medida que envejecen (Yun *et al.*, 2015; Yu y Yun, 2020; Yun, 2021).

A pesar de que las razones mecanicistas de este fenómeno siguen siendo difíciles de entender, es importante destacar que las salamandras tienen un mecanismo inmunodependiente muy rápido y eficiente para la eliminación de células senescentes, lo que puede explicar la escasa acumulación

de este tipo de células (Yun *et al.*, 2015; Walters y Yun, 2020). Otra posibilidad es que las células de las salamandras estén evitando la senescencia replicativa, una forma de arresto de las células senescentes provocada por el acortamiento de los telómeros (Yun, 2021). Si bien este proceso no se ha estudiado en los urodelos, las observaciones sugieren que las células de salamandra no exhiben senescencia replicativa en cultivo (Ferretti y Brockes, 1988). Dada la fuerte correlación entre la tasa de acortamiento de los telómeros y la esperanza de vida de una especie (Whittemore *et al.*, 2019), este es un tema con gran potencial para la investigación (Yun, 2021).

Otro factor que podría contribuir a la falta de acumulación de células senescentes en las salamandras es la existencia de mecanismos bien orientados de mantenimiento del genoma. Estudios recientes sugieren que los ajolotes emplean mecanismos sólidos de respuesta al daño del DNA para promover la progresión adecuada del ciclo celular tras una lesión (Sousounis *et al.*, 2020), lo que puede restringir la generación excesiva de células senescentes en contextos regenerativos. Además, es posible que los grandes genomas de los urodelos, de entre ~20 y ~32 Gb (Elewa *et al.*, 2017; Nowoshilow *et al.*, 2018; J. J. Smith *et al.*, 2019), proporcionen un nivel adicional de protección contra desafíos mutagénicos, ya que la presencia de extensas regiones no codificantes y no regulatorias podrían ayudar a aliviar la carga mutagénica (Poetsch *et al.*, 2018).

Con estos datos, algunos autores han sugerido que la capacidad regenerativa de los urodelos no disminuye con el tiempo y no se ve afectada por eventos de regeneración repetitivos (Yun, 2015, 2021). Sin embargo, a pesar de que *A. mexicanum* sí conserva durante toda su vida una notable capacidad regenerativa que supera con creces la de los mamíferos, existen reportes contrarios que indican que su éxito regenerativo disminuye tanto con las lesiones repetidas (D. M. Bryant, Sousounis, Payzin-Dogru *et al.*, 2017) como con la edad (**Figura 1.3**) (Vieira *et al.*, 2020). Estas observaciones opuestas sobre el efecto del envejecimiento sobre las capacidades regenerativas podrían deberse a las diferencias genotípicas entre las cepas de ajolotes que se han empleado en los estudios de regeneración (Yun, 2021). Por un lado, los reportes de un decremento en las capacidades regenerativas como efecto de la edad se han basado en estudios que utilizaron cepas americanas del ajolote mexicano, mientras que estudios similares en cepas europeas no han mostrado el deterioro

regenerativo descrito (Yun, 2021). Hasta el momento, no ha habido un análisis comparativo de los efectos de la edad que incluya cepas de ajolotes nativos (del Valle de México), en las que las afectaciones del envejecimiento sobre el fenotipo regenerativo podrían ser más evidentes.

De cualquier manera, ha sido bien documentado que las capacidades para reemplazar tejidos durante la homeostasis y curar lesiones agudas se ven afectadas negativamente por el envejecimiento en la mayoría de los organismos, y el ajolote, a pesar de sus excepcionales capacidades regenerativas, parece no ser la excepción (Vieira *et al.*, 2020). Un ejemplo de los posibles efectos del envejecimiento sobre la regeneración es el caso del anélido de agua dulce *Aeolosoma viride*. C.-F. Chen *et al.* (2018) han reportado que la capacidad regenerativa de *A. viride* disminuye con la edad, y que la regulación oportuna de las funciones de la telomerasa es fundamental para el proceso de regeneración en este organismo (**Figura 1.4**). A pesar de que la telomerasa está de por sí constantemente activa y la longitud de los telómeros se mantiene estable con la edad, se ha observado actividad de la telomerasa también en los sitios de regeneración, lo que podría significar que esta enzima contrarresta la erosión de los telómeros provocada por la proliferación celular. Estos resultados confirman la idea de que el decremento en las capacidades regenerativas como efecto del envejecimiento, ya sea en este

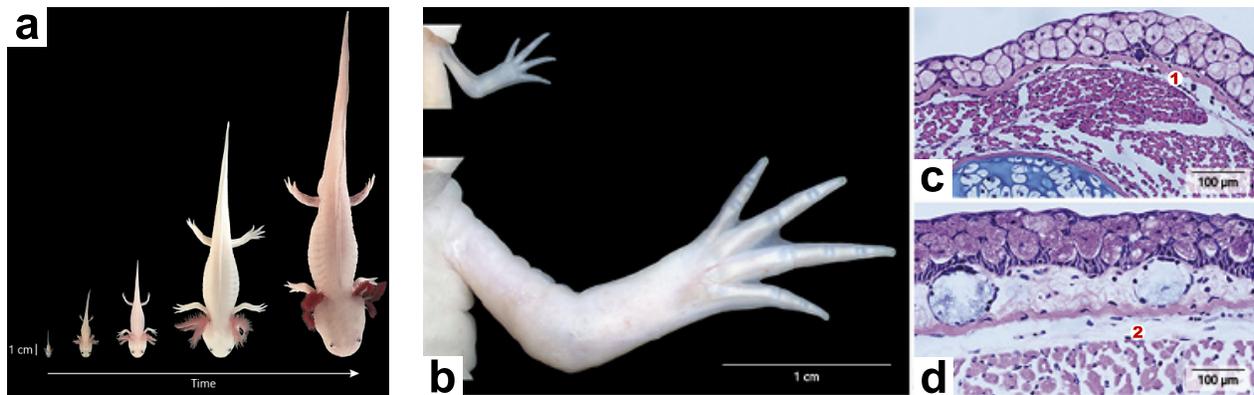


Figura 1.3. Efectos del envejecimiento en la morfología y anatomía del ajolote mexicano. (a) Los ajolotes continúan creciendo después de la madurez sexual. Imágenes en vivo de una cría de ajolote (~3 semanas de edad), un juvenil joven (~3 meses de edad), un juvenil tardío (~5 meses de edad), un adulto sexualmente maduro (~1 año de edad) y un adulto de 3 años mostrando el espectacular aumento de tamaño con el tiempo. (b-d) Cambios en la morfología de la piel de los ajolotes a medida que envejecen. (b) Imágenes en vivo de las extremidades anteriores de un animal juvenil (arriba) y un adulto sexualmente maduro (abajo). (c,d) Tinción histológica de secciones de las extremidades en (b) mostrando la piel de espesor total donde «1» indica la capa dérmica de la extremidad en etapa juvenil y «2» indica la capa dérmica de la extremidad en etapa adulta. Figuras adaptadas con permiso desde Vieira *et al.* (2020); Copyright © 2020 Karger Publishers, Basel, Switzerland.

modelo invertebrado o en vertebrados como el ajolote, involucra múltiples factores moleculares, y no necesariamente está determinado por una sola característica como la longitud de los telómeros (C.-F. Chen *et al.*, 2018).

En términos fisiológicos, la relación inversa entre las capacidades regenerativas y la edad que se ha observado en algunas cepas de *A. mexicanum* podría verse influenciada por una gran serie de factores: el aumento en el tamaño y la masa del animal y las extremidades, la osificación del esqueleto, el engrosamiento y la pérdida de flexibilidad de la piel, cambios en la función nerviosa, las lesiones repetidas, los factores circulantes, las hormonas, la respuesta inmune, el metabolismo, o la metamorfosis (S. V. Bryant *et al.*, 1981; D. M. Bryant, Sousounis, Farkas *et al.*, 2017; D. M. Bryant, Sousounis, Payzin-Dogru *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2020). Considerando la gran cantidad de variables que podrían verse afectadas por envejecimiento, es posible que las causas moleculares de esta disminución en las capacidades regenerativas vayan más allá de los genes codificantes y sus productos, e involucren otros elementos con gran potencial regulatorio, como lo son las secuencias no codificantes del genoma.

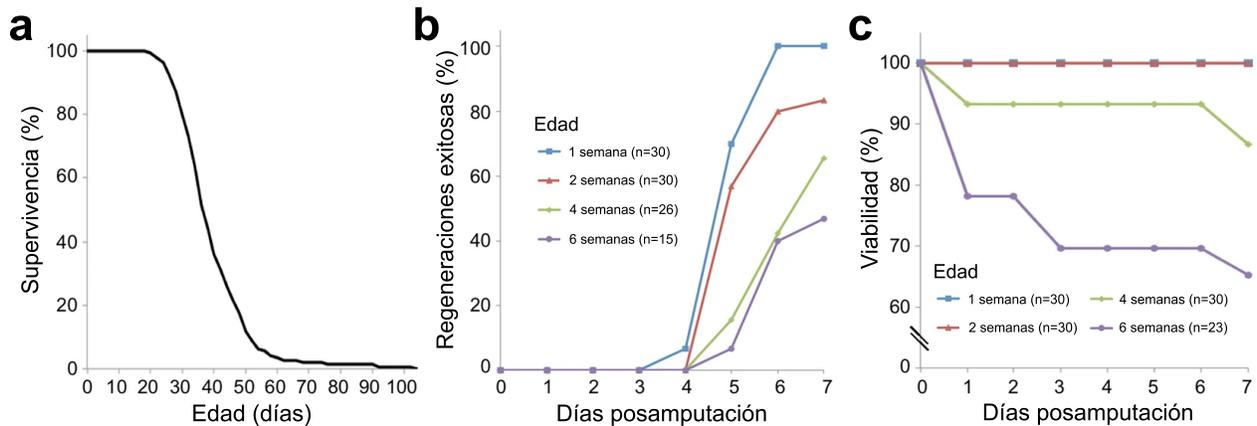


Figura 1.4. Efectos del envejecimiento sobre la regeneración anterior en el anélido de agua dulce *Aeolosoma viride*. (a) Curva de supervivencia de *A. viride*. Un total de 143 animales fueron cultivados individualmente y observados cada 48 horas. El tiempo medio de supervivencia fue de 39.8 ± 11.8 días, con una esperanza de vida máxima de 104 días y mínima de 20 días. (b) Capacidad regenerativa anterior de *A. viride* a diferentes edades. Se sincronizaron animales de 1, 2, 4 y 6 semanas de edad mediante bisección en la zona de fisión. Después de 3 días de recuperación, se retiraron los segmentos anteriores y se registraron los porcentajes de animales que se regeneraron exitosamente. (c) Viabilidades de *A. viride* durante la regeneración anterior a diferentes edades. Figura traducida y adaptada desde C.-F. Chen *et al.* (2018).

1.3. Los elementos repetitivos eucariotas

Hasta hace poco, la investigación sobre los factores moleculares que subyacen a la biología regenerativa se ha caracterizado principalmente por estudios de genes codificantes de proteínas (Mashanov *et al.*, 2012b). Sin embargo, en el caso del ajolote, los numerosos elementos repetitivos (RE) que constituyen hasta el ~65 % de su genoma de ~32 Gb (Nowoshilow *et al.*, 2018) son particularmente interesantes como interactores moleculares con un papel potencial durante la regeneración.

Las secuencias de DNA repetitivas (repeticiones, repetidos o elementos repetitivos) son patrones de ácidos nucleicos que se presentan en múltiples copias a lo largo del genoma (Biscotti *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2023). La importancia de cada tipo de DNA repetitivo para un genoma u organismo depende de muchos factores, entre ellos los papeles estructurales y funcionales, las posiciones genómicas, las longitudes y el número de estas repeticiones (Touati *et al.*, 2021). Para una revisión detallada de los tipos de elementos repetitivos, véanse Biscotti *et al.* (2015) y Liao *et al.* (2023). Brevemente, las secuencias de DNA se pueden clasificar en tres grupos según su frecuencia en el genoma (Touati *et al.*, 2021), tal como se muestra en las **Figuras 1.5 y 1.6**.

El primer grupo está compuesto por repeticiones de alta frecuencia, también conocidas como secuencias de DNA satélite (satDNA), que se encuentran en varias regiones de los cromosomas, incluidas las regiones pericentroméricas, subteloméricas e intersticiales (Liao *et al.*, 2023) (**Figura 1.5**).

El segundo grupo comprende las repeticiones de frecuencia moderada, las cuales suelen tener una longitud de 500 a 300 000 pb y se repiten entre 10 y 105 veces (Novák *et al.*, 2020). Estas repeticiones se clasifican además en dos subcategorías: (A) microsátélites y minisátélites (*variable number tandem repeats* o VNTRs) y (B) repeticiones dispersas, que se componen principalmente de elementos transponibles (McNulty y Sullivan, 2018). Vale la pena señalar que muchas repeticiones de frecuencia moderada han sido implicadas en la regulación de la expresión génica (Youssef *et al.*, 2019; Liao *et al.*, 2023).

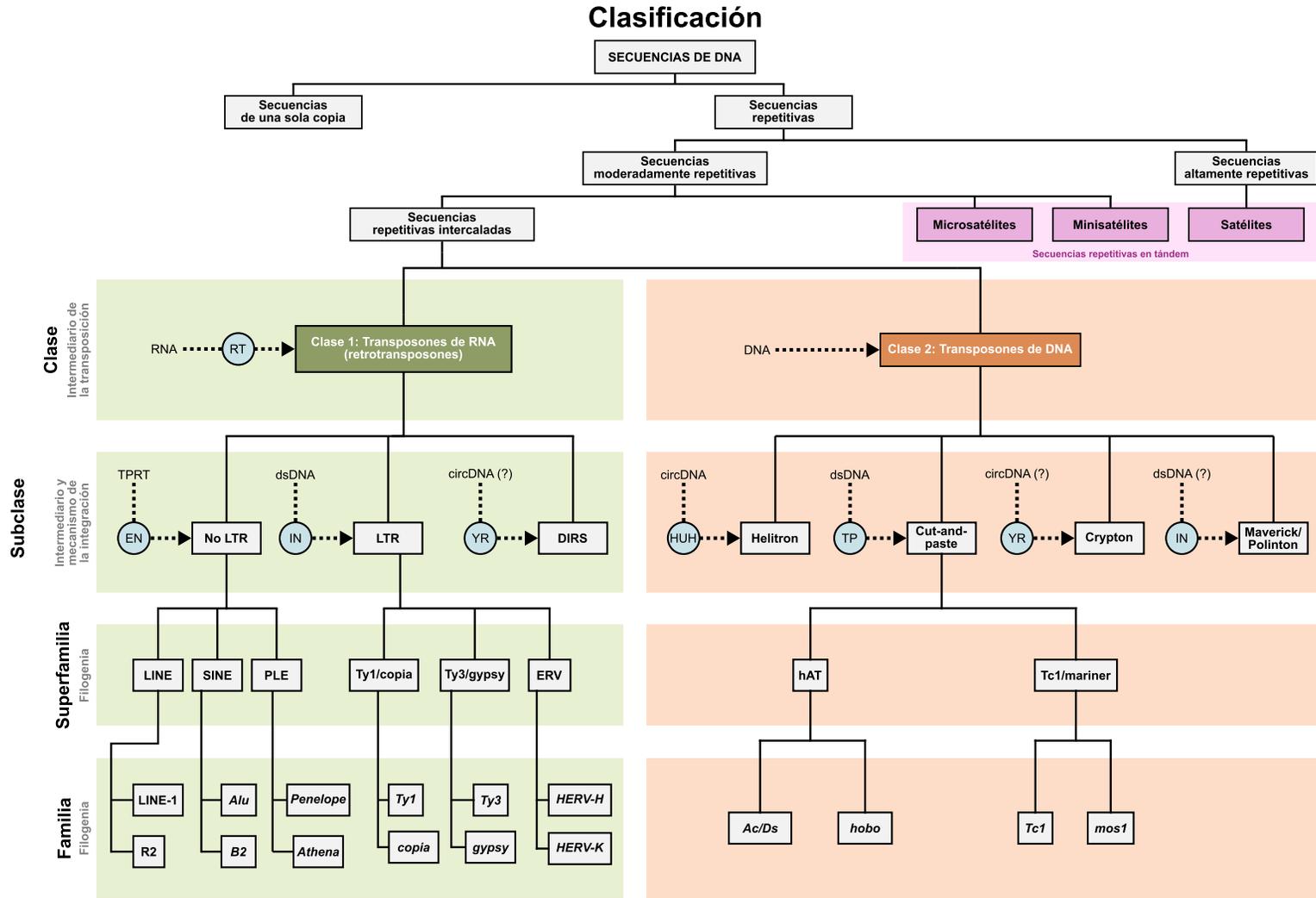


Figura 1.5. Clasificación de los elementos repetitivos eucariotas. Se muestran los distintos tipos de repeticiones de DNA y las características y relaciones clave entre clases, subclases, superfamilias y familias de elementos transponibles (TEs). Los círculos azules representan enzimas codificadas por TEs. circDNA: intermedio de DNA circular; DIRS: secuencia repetida intermedia de *Dictyostelium*; dsDNA: intermedio de DNA bicatenario lineal; EN: endonucleasa; IN: integrasa; PLE: elementos similares a Penelope; HUH: proteína Rep/Helicasa con actividad endonucleasa HUH (histidina-hidrofóbico-histidina); RT: transcriptasa inversa; TP: transposasa; TPRT: transcripción inversa cebada por el objetivo; YR: tirosina recombinasa. Figuras adaptadas desde Bourque *et al.* (2018) y Liao *et al.* (2023).

Según la disposición de las unidades repetitivas, las repeticiones se pueden clasificar en dos tipos: repeticiones en tándem (TRs) y repeticiones intercaladas (Ganten *et al.*, 2006) (**Figura 1.5**). Las TRs son arreglos formados por la aparición repetida de unidades de secuencias básicas conectadas de extremo a extremo (Genovese *et al.*, 2018). Las TRs, especialmente el DNA satélite, están agrupados en regiones cromosómicas específicas, como centrómeros, tetrámeros y telómeros, que desempeñan un papel esencial en los procesos celulares, incluida la segregación cromosómica, la organización del genoma y la protección de los extremos de los cromosomas (Richard *et al.*, 2008). Las repeticiones intercaladas, también conocidas como transposones o elementos transponibles (TEs), se subclasifican en transposones de DNA y RNA con base en su modo de transposición (Kojima, 2020).

Los transposones de RNA utilizan un mecanismo de cortar y pegar, donde la enzima transposasa extrae el transposón de su ubicación original y lo inserta en otra parte del genoma a través de un intermediario de RNA. Los transposones de DNA también utilizan un mecanismo de cortar y pegar, pero se mueven directamente como DNA y se extirpan de su locus donante y se reinsertan en otro lugar mediante un mecanismo conservativo. Las estructuras típicas de los retrotransposones y transposones de DNA se ilustran en la **Figura 1.6**.

Los transposones de DNA, también conocidos como transposones de Clase II, se pueden subclasificar en cuatro superfamilias según sus constituyentes y patrones de transposición: TEs de repetición invertida miniatura (MITEs), Cryptons, Mavericks (o Polintons) y Helitrons (**Figura 1.5**). Los MITEs son transposones no autónomos que se encuentran principalmente en las regiones no codificantes de los genomas de plantas y animales (Y. Han y Wessler, 2010), y tienen la capacidad de alterar las estructuras y funciones de los genes (**Figura 1.6**). Los Cryptons son una clase única de transposones de DNA que utilizan tirosina recombinasa (YR) para cortar y volver a unir moléculas de DNA recombinantes (Kojima y Jurka, 2011), lo que les permite incorporar más secuencias de YRs e impulsar la evolución animal. Los Mavericks son grandes transposones de DNA que se encuentran comúnmente en genomas eucariotas, con secuencias de duplicación del sitio objetivo (TSDs) de ~6 pb y genes homólogos a proteínas virales (Krupovic y Koonin, 2015) (**Figura 1.6**). Los Helitrons son transposones eucariotas descubiertos recientemente y presentes en muchas especies

de plantas y animales (T.-f. Lee *et al.*, 2012) que se propagan a través de un mecanismo de círculo rodante (*rolling circle* o RC) pero no generan repeticiones terminales ni TSDs. La replicación de los transposones RC sigue un modelo de transposición semi-replicativo en el que solo una hebra del transposón transpuesto se transfiere de un sitio genómico a otro, donde sirve como plantilla para la síntesis de DNA catalizada por la maquinaria de reparación del hospedero (Kapitonov y Jurka, 2007). Durante este proceso, la transferencia de la hebra del transposón se une covalentemente a la hebra de DNA objetivo, formando un intermediario de círculo rodante (Mendiola *et al.*, 1994; Khan, 2000; Kapitonov y Jurka, 2001). En general, los transposones de Clase II se caracterizan por contener secuencias terminales de repetición invertida (TIRs), que son complementarias entre sí en los extremos izquierdo y derecho del transposón. También son conocidos como genes saltarines, pues pueden moverse e integrarse en diversas regiones genómicas. Los transposones de DNA, que constituyen aproximadamente el 5 % del genoma humano (Pace y Feschotte, 2007) y ~6.75 % del genoma del ajolote (Nowoshilow *et al.*, 2018), se consideran fósiles de DNA porque actualmente ninguna de sus familias permanece activa en la mayoría de los mamíferos, incluidos los humanos (Muñoz-López y García-Pérez, 2010; Kojima, 2018). En el ajolote no hay estudios que hayan investigado la actividad de los transposones de DNA, sin embargo, se sabe que los transposones de RNA, los cuales son más abundantes en su genoma (~38.33 %, ~10.8 Gb), han pasado por un largo período de actividad reciente y una gran expansión (Nowoshilow *et al.*, 2018).

Los transposones de RNA, también conocidos como retrotransposones o transposones de Clase I, se pueden clasificar en cinco superfamilias según sus estructuras y patrones de transposición: repeticiones terminales largas (LTRs), elementos nucleares intercalados largos (LINEs), elementos nucleares intercalados cortos (SINEs), secuencias repetidas intermedias de *Dictyostelium* (DIRS) y elementos similares a Penelope (PLEs) (**Figura 1.5**) (Muszewska *et al.*, 2011; Finnegan, 2012). Los retrotransposones LTR están relacionados con los retrovirus y tienen LTRs en sus extremos 5' y 3', que probablemente se originaron a partir de infecciones retrovirales antiguas (Thompson *et al.*, 2016). Recientemente, se ha descubierto que las LTRs están enriquecidas con secuencias *enhancer* activas, firmas epigenéticas distintivas y sitios de unión de factores de transcripción (TFs) en líneas humanas

de cáncer de colon e hígado, así como en células epiteliales no malignas de la retina (Karttunen *et al.*, 2023). Por otro lado, los LINEs contienen un promotor interno que impulsa la expresión de la maquinaria de transposición, incluida la transcriptasa inversa y una endonucleasa (**Figura 1.6**) (Ardeljan *et al.*, 2017). También se ha reportado que algunas secuencias no codificantes derivadas de LINEs presentan actividad de *enhancers*, que se induce por la actividad de TFs involucrados en la respuesta inmune (**Figura 1.6**) (H.-E. Lee *et al.*, 2021). Por su parte, los SINEs dependen de LINEs para la transposición, y su especificidad está determinada por sus extremos 5'. La mayoría de

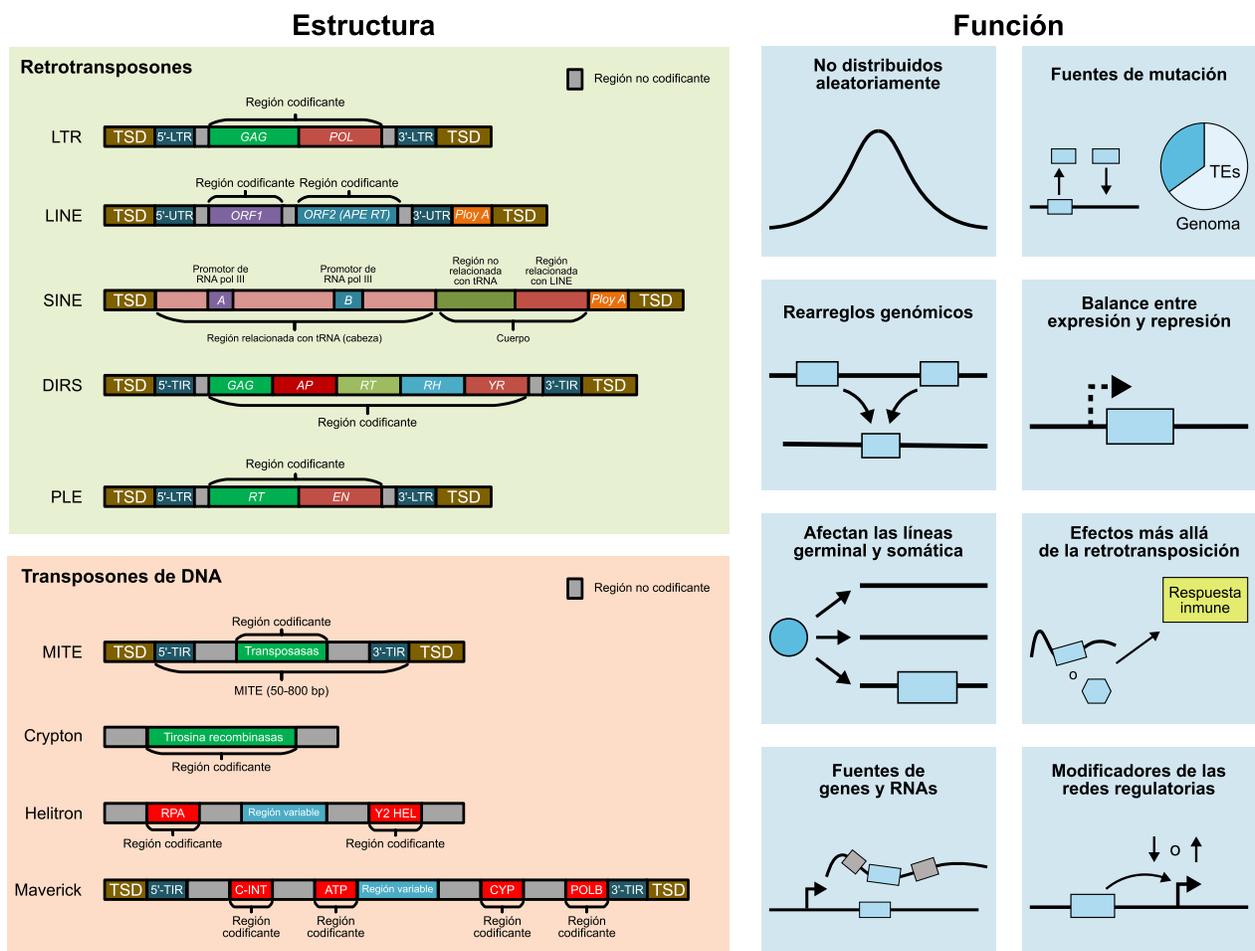


Figura 1.6. Estructura y función de los elementos repetitivos eucariotas. Izquierda: Estructuras típicas de retrotransposones y transposones. LTR: repetición terminal larga; LINE: elemento nuclear intercalado largo; SINE: elemento nuclear intercalado corto; MITE: elemento transponible de repetición invertida miniatura. **Derecha:** Ejemplos de cómo los TEs pueden afectar los genomas de manera directa e indirecta. Los cuadros azules representan TEs, los cuadros grises representan exones canónicos y los cuadros negros representan lecturas de secuenciación. Las flechas en ángulo recto representan promotores de genes o TEs. Figuras adaptadas desde Bourque *et al.* (2018) y Liao *et al.* (2023).

los SINEs se derivan de tRNA, 7SL RNA o 5S RNA y tienen un promotor para la RNA polimerasa III (Kramerov y Vassetzky, 2011; G. Han *et al.*, 2021). Los retrotransposones DIRS, que tienen tirosina recombinasa, difieren de las integrasas o endonucleasas comúnmente utilizadas por los retrotransposones para la integración genómica específica del sitio objetivo (Wiegand *et al.*, 2014; Malicki *et al.*, 2020). Los PLEs comparten un ancestro con las telomerasas transcriptasas inversas (TERTs) y tienen características únicas en la filogenia de retroelementos (Y. Wang *et al.*, 2020). Las TERTs son componentes importantes del complejo de telomerasa que mantienen los extremos lineales de los cromosomas en la mayoría de los eucariotas (Arkhipova, 2006; Gladyshev y Arkhipova, 2007).

Tanto los organismos eucariotas como los procariotas contienen una cierta proporción de repeticiones en el genoma (Jurka *et al.*, 2007; Mrázek *et al.*, 2007; Treangen *et al.*, 2009; J. N. Wells y Feschotte, 2020; Liao *et al.*, 2023). Los elementos transponibles rara vez, o nunca, se distribuyen aleatoriamente, ya que exhiben varios niveles de preferencia para la inserción dentro de ciertas regiones o compartimentos del genoma (Bourque *et al.*, 2018). Estos a menudo están guiados por fuerzas selectivas opuestas, un acto de equilibrio entre facilitar la propagación futura y mitigar los efectos nocivos sobre la función de la célula hospedera. La distribución de los elementos repetitivos en un genoma también determina sus efectos sobre la función del hospedero, entre los cuales están la regulación en *cis*, la modificación de las redes transcripcionales y la activación de la respuesta inmune, entre muchas otros (**Figura 1.6**).

En particular, en los mamíferos los elementos repetitivos representan del 25 % al 50 % de su genoma completo (Liao *et al.*, 2023). Por ejemplo, alrededor del 50 % del genoma humano consta de repeticiones (Bustos *et al.*, 2023), mientras que aproximadamente el 4 % de los genes humanos albergan elementos transponibles en sus regiones codificantes de proteínas (Nekrutenko y Li, 2001). La porción repetitiva de los genomas de los mamíferos está dominada por LINEs y SINEs, seguidos por los retrotransposones LTR y luego los transposones de DNA (Platt *et al.*, 2018). En la mayoría de los mamíferos, ~ 75 % de la porción repetitiva de su genoma (su *repetidoma*) se deriva de retrotransposones no LTR (Lander *et al.*, 2001; Chinwalla *et al.*, 2002; Platt *et al.*, 2018). Los retrotransposones no LTR (LINE y SINE) constituyen alrededor del 35 % de los genomas de

los mamíferos (H. Lee *et al.*, 2022). Por su parte, los retrotransposones LTR están presentes en los genomas de mamíferos en un número de copias moderadamente alto y pueden ocupar entre 4 % y 10 % del genoma (Mikkelsen *et al.*, 2007). Los transposones de DNA suelen estar presentes en números de copias más bajos en relación con los retrotransposones, ocupando menos del 3 % de los genomas de los mamíferos (Platt II y Ray, 2012). Por el contrario, según el ensamblaje más reciente de la secuencia del genoma para la cepa *d/d* del ajolote (AmexG_v6.0-DD), alrededor del 65 % (~18.6 Gb) del genoma de *A. mexicanum* consta de secuencias repetitivas (Nowoshilow *et al.*, 2018). Además, la mayor parte del repetidoma del ajolote está compuesta por retroelementos de repetición terminal larga de la superfamilia Ty3. En total, el genoma del ajolote contiene ~26 % (~7.2 Gb) de LTRs y ~11 % (~3.2 Gb) de retrotransposones Ty3.

1.3.1. Los elementos repetitivos y la regeneración

Diversos estudios han descrito los efectos negativos de la actividad de los elementos repetitivos tanto a nivel genómico como fisiológico. La retrotransposición puede introducir patrones de empalme alternativo o *alternative splicing* potencialmente catastróficos y generar cambios en el perfil de expresión génica característicos de algunas enfermedades (Sinibaldi-Vallebona *et al.*, 2006; J.-M. Chen *et al.*, 2010; Montoya-Durango y Ramos, 2010; Zhu, Kuo *et al.*, 2012). En tales casos, el silenciamiento de REs activos podría ser una parte crítica de la regulación y el mantenimiento de la homeostasis celular. Por el contrario, otros trabajos han demostrado que la actividad de algunos REs, especialmente los elementos transponibles, puede ser beneficiosa para sus hospederos (Muotri *et al.*, 2007; Feschotte, 2008; Faulkner y Carninci, 2009; Mashanov *et al.*, 2012b). Al regular la expresión de genes condicantes a nivel transcripcional y postranscripcional, los retrotransposones pueden realizar funciones importantes en la embriogénesis, como afectar la pluripotencia y dirigir las decisiones sobre el destino celular (Muotri *et al.*, 2005, 2007; Feschotte, 2008; Macfarlan *et al.*, 2012; Mashanov *et al.*, 2012b). No obstante, la participación de los REs en la regeneración animal ha sido abordada sólo en unos pocos estudios en escasos sistemas modelo (Mashanov *et al.*, 2012a, 2012b; Zhu, Kuo *et al.*, 2012).

Por ejemplo, Mashanov *et al.* (2012a) han reportado cambios a gran escala en la actividad transcripcional de LTRs durante la regeneración de los órganos radiales en el pepino de mar *Holothuria glaberrima*. Los equinodermos como *H. glaberrima* se encuentran entre los metazoos con mejores capacidades regenerativas y, por lo tanto, también representan un gran potencial para los estudios de la evolución de la biología regenerativa y la investigación biomédica dentro de Deuterostomia. Mediante análisis transcriptómicos de alto rendimiento, los autores identificaron 36 retrotransposones LTR pertenecientes a los clados Bel y Ty3 en órganos radiales en heridas e ilesos y, de estos, 20 LTRs se expresaron diferencialmente durante la regeneración (Mashanov *et al.*, 2012a, 2012b). En particular, un elemento, Ty3-1_Hg (ver nomenclatura: Wei *et al.*, 2022), mostró un aumento drástico en la expresión (>50 veces) en la glía y las neuronas del sistema nervioso central en regeneración. Además, indicaron que los aumentos en la transcripción de retrotransposones no tuvieron un efecto perjudicial sobre la integridad genómica ni dieron como resultado procesos de muerte celular programada, sino que contribuyeron a la regeneración.

En el caso del ajolote, Zhu, Kuo *et al.* (2012) reportaron sobreexpresión y mayor retrotransposición de un elemento nuclear largo intercalado 1 (LINE-1) en los tejidos desdiferenciados del blastema de la extremidad. Utilizando qPCR, demostraron que había una gran regulación al alza de la actividad transcripcional de LINE-1 tan pronto como 2 días después de la amputación (dpa). También informaron que otros TEs putativos y piRNAs relacionados con LINE-1 parecen expresarse o activarse transcripcionalmente en la extremidad regenerativa, con dinámicas diferentes. Aunque los autores no propusieron una función precisa para LINE-1 u otros elementos repetitivos en la regeneración, sugirieron que su reactivación es un fenómeno ubicuo y puede servir como marcador de la desdiferenciación celular en las primeras etapas de la regeneración de las extremidades.

Aunque los estudios tanto en *A. mexicanum* como en *H. glaberrima* han demostrado una expresión diferencial de retroelementos durante la regeneración, sus interpretaciones de la respuesta específica y la función de los REs después de una lesión traumática aún son contrastantes. Una posibilidad es que la actividad transcripcional de los retrotransposones en el tejido en regeneración sea una consecuencia no específica de una reducción general del silenciamiento epigenético, que en el

caso del ajolote podría permitir que las células desdiferenciadas del blastema reviertan y establezcan un estado celular único similar al de la línea germinal (Zhu, Kuo *et al.*, 2012). En tal caso, los transposones también podrían estar haciendo uso de la activación global de la cromatina inducida por la lesión y de la desrepresión transcripcional causada por el proceso de desdiferenciación (**Figura 1.7**) para amplificarse y así aumentar sus probabilidades de sobrevivir a la lisis de su célula hospedera y ser absorbidos por otras células (Wilkins, 2010; Mashanov *et al.*, 2012b).

Por el contrario, Mashanov *et al.* (2012b) sugieren que los cambios en la expresión de retrotransposones durante la regeneración podrían no representar una mera explotación de la maquinaria transcripcional del hospedero con fines de propagación, sino más bien que esta desregulación de la transcripción podría ser controlada específicamente por el sistema del hospedero a nivel de tejido, célula y grupo de elemento repetitivo. Una razón detrás de esta perspectiva es que algunos retrotransposones LTR se comportan de manera diferente en distintos órganos en regeneración de la misma especie. Por ejemplo, Ty3-1_Hg y Ty3-2_Hg muestran perfiles transcripcionales significativamente distintos en el tubo digestivo en regeneración en comparación con el complejo de órganos radiales en regeneración en *H. glaberrima* (Mashanov *et al.*, 2012a, 2012b). Esto sugiere una regulación de la transcripción LTR específica del tejido. En segundo lugar, aunque los transcritos derivados de transposones se expresan altamente en las proximidades de una lesión de un tejido regenerable, siempre hay células donde los retrotransposones no están transcripcionalmente activos. Por lo tanto, la expresión de retroelementos podría estar siendo controlada específicamente a nivel de cada célula. En tercer lugar, los diversos retrotransposones muestran diferentes tipos de respuestas transcripcionales durante la regeneración: algunos están regulados al alza o a la baja, y otros no muestran ningún cambio. Por tanto, la expresión de retrotransposones podría controlarse de forma específica para cada familia, subfamilia o locus de elemento repetitivo.

En conjunto, estos hallazgos indican que los REs están controlados específicamente por el hospedero, responden de manera coordinada a las señales de regeneración y, por lo tanto, pueden desempeñar algunas funciones no reconocidas en el crecimiento de un nuevo tejido tras un trauma (Mashanov *et al.*, 2012b). En este contexto, el estado fisiológico del organismo también podría

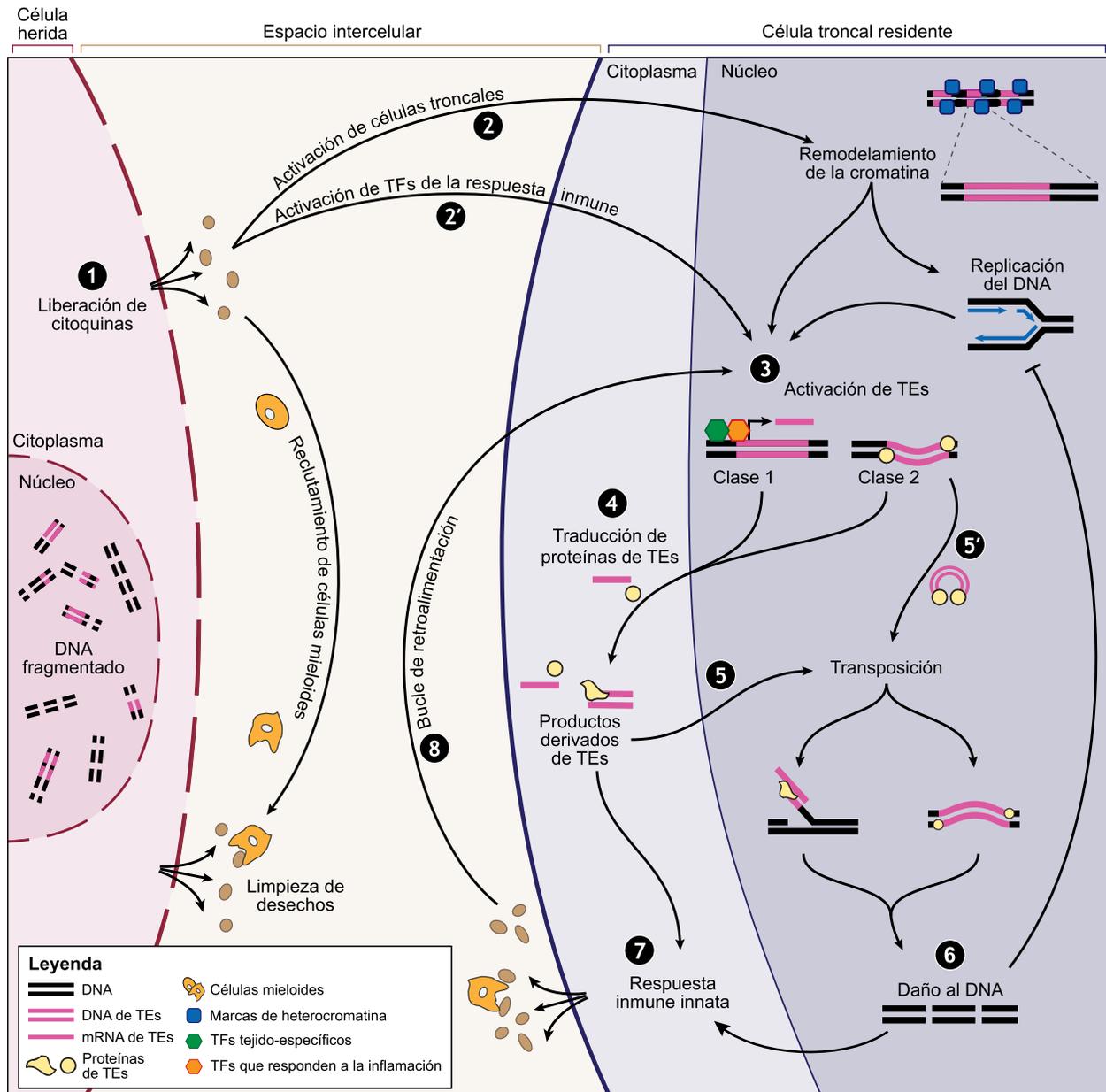
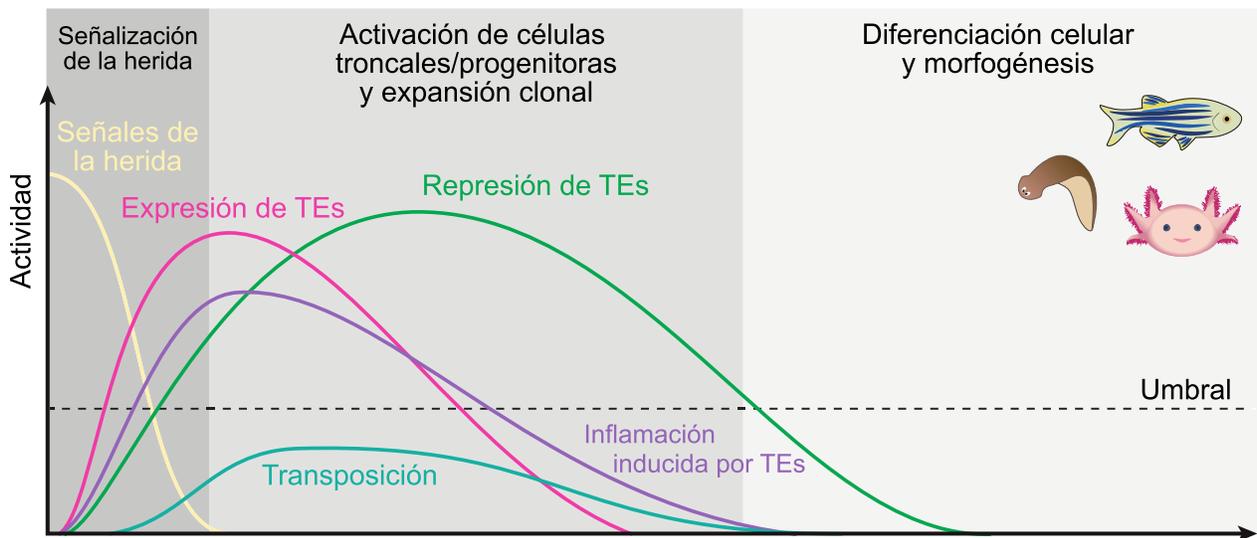


Figura 1.7. El entorno regenerativo es propicio para la actividad de los elementos transponibles (TEs). (1) Las señales inducidas por la lesión son liberadas por células dañadas que reclutan leucocitos en el sitio de la lesión. (2) Las señales inflamatorias inducen la activación de las células madre residentes, lo que produce cambios en la accesibilidad de la cromatina y la expresión genética. (2') Las señales inflamatorias desencadenan factores de transcripción inmunes específicos para unirse a los promotores TE. (3) Los TEs «sienten» el entorno celular dinámico y comienzan a expresarse o activarse. (4) El mRNA de TEs se traslada al citoplasma para su traducción y/o transcripción inversa (RT). (5) Los productos de Clase I vuelven a entrar en el núcleo y se «copian» a sí mismos en un nuevo locus genómico, mientras que (5') los productos de Clase II vuelven a entrar en el núcleo y «cortan y pegan» en un nuevo locus. (6) La transposición produce daños en el DNA, lo que inhibe la replicación del DNA. (7) Los productos codificados por TEs y las señales de daño del DNA activan la respuesta inmune innata intracelular del hospedero. (8) La inflamación inducida por TEs podría propagar un circuito de retroalimentación inflamatoria. Figura adaptada y traducida desde Angileri *et al.* (2022) con permiso obtenido de Copyright Clearance Center, Inc.

ser un factor importante que influya en la función coordinada de los retrotransposones durante la regeneración. Se han planteado dos preguntas principales sobre el papel de los retroelementos en el proceso regenerativo: (1) ¿qué causa el cambio en sus niveles de expresión? y (2) ¿cuáles son las repercusiones de esta desregulación en el organismo hospedero? (Mashanov *et al.*, 2012b).

Recientemente, Angileri *et al.* (2022) propusieron una hipótesis sobre el papel de los elementos transponibles en la regeneración, en la que sugieren que la represión de los TEs es necesaria para la regeneración de tejidos (**Figuras 1.7 y 1.8**). Los autores han resaltado que una característica distintiva de la lesión tisular es la liberación de factores de señalización inflamatoria y la activación de la inmunidad innata (Eming *et al.*, 2017), que se han observado en múltiples especies (Simkin *et al.*, 2017; Ferrario *et al.*, 2018; Leigh *et al.*, 2018; Tsarouchas *et al.*, 2018; Tsai *et al.*, 2019; Comish *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020; Swanson *et al.*, 2020; Bodó *et al.*, 2021; Leach *et al.*, 2021; Y.-C. Wu *et al.*, 2022). En este sentido, la actividad de los TEs está estrechamente relacionada con el sistema inmunológico innato, ya sea que sea desencadenada por una infección, lesión u otros factores estresantes celulares (Gázquez-Gutiérrez *et al.*, 2021; Hale, 2022). Por ejemplo, muchas familias de LTRs albergan promotores inducibles por interferón a los que pueden unirse factores de transcripción de la inmunidad innata, modificando así la expresión de los TEs o genes cercanos como parte de la respuesta inmune (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2012; Chuong *et al.*, 2016; Manghera *et al.*, 2016; Srinivasachar Badarinarayan *et al.*, 2020). Además, los productos derivados de TEs, incluido el RNA bicatenario (dsRNA), el cDNA y las proteínas, activan la inmunidad innata de la célula hospedera cuando se unen a sensores antivirales (Gázquez-Gutiérrez *et al.*, 2021). Por otro lado, algunos transcritos de TEs forman dsRNA a través de emparejamientos intermoleculares o intramoleculares reconocidos por las proteínas antivirales citoplasmáticas RIG-I, MDA-5 y ZBP1, y pueden instigar una respuesta inmune innata (Ahmad *et al.*, 2018; Lefkopoulos *et al.*, 2020; R. Wang *et al.*, 2020).

Especies con altas capacidades regenerativas



Especies con menores capacidades regenerativas

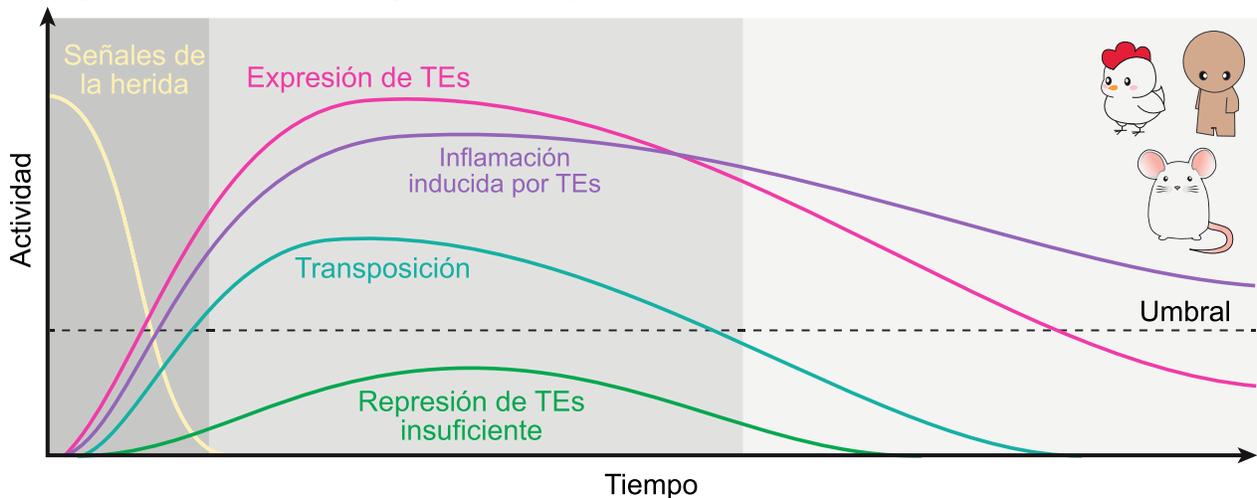


Figura 1.8. Hipótesis de Angileri *et al.* (2022) sobre el rol de los elementos transponibles en la regeneración.

Hipótesis: la represión de los elementos transponibles (TEs) es necesaria para la regeneración de tejidos. La expresión de TEs (magenta) aumenta poco después de la lesión (amarillo), lo que da como resultado una señalización inflamatoria inducida por TEs (púrpura). Los TE que conservan DNA funcional y secuencias codificantes de proteínas funcionales intentarán transponerse (azul) y, dado el tiempo suficiente, la acumulación de actividad mutagénica de los TEs superaría el el «umbral» de la célula hospedera (línea punteada), alterando la homeostasis y obligando a la célula a entrar en senescencia. En respuesta, las células del hospedero deben implementar mecanismos de represión de TEs (verde) para limitar su actividad. **Arriba:** Los organismos regenerativamente competentes (por ejemplo, planaria, pez cebra y ajolote) implementan eficazmente medidas contra los TEs, manteniendo así su actividad por debajo de los niveles umbral y permitiendo una regeneración exitosa (gris). **Abajo:** Los organismos menos competentes desde el punto de vista regenerativo (por ejemplo, humanos, pollos y ratones) no pueden limitar eficazmente los eventos mutagénicos de TEs e incurrir en demasiados déficits celulares, lo que lleva a un estancamiento de la regeneración. Figura adaptada y traducida desde Angileri *et al.* (2022) con permiso obtenido de Copyright Clearance Center, Inc.

Todos estos ejemplos, según Angileri *et al.* (2022), subrayan una íntima interconexión entre los TEs y la inmunidad del hospedero. En el contexto de la regeneración, esta interacción podría desencadenar un circuito de retroalimentación positiva que, si no se controla, prolongaría la señalización inflamatoria dentro del microambiente de la herida y crearía una barrera para la regeneración del tejido (**Figura 1.7**). Con base en esto, una posible explicación por la cual algunas especies no presentan capacidades regenerativas tan excepcionales como las del ajolote, las planarias, o el pez cebra, es la nula o reducida capacidad de sus tejidos para limitar los efectos inflamatorios, inmunes, mutagénicos o epigenéticos que resultan de la actividad de los elementos transponibles tras una lesión (**Figura 1.8**).

Además, si en el ajolote los perfiles de expresión de sus elementos repetitivos pueden ser modificados al atravesar un proceso fisiológico o patológico como el envejecimiento, también es probable que esto modifique el estado basal a partir del cual el organismo responde al daño tisular y regula la regeneración. Una de las consecuencias más reconocidas del envejecimiento en mamíferos es la senescencia y disminución de la función inmune (Montecino-Rodriguez *et al.*, 2013; Yousefzadeh *et al.*, 2021). A pesar de que la senescencia en los ajolotes es mucho menor que en la observada en los mamíferos, la desregulación transcripcional de elementos repetitivos podría ser una causa o un efecto de los cambios en los factores circulantes, la producción hormonal, la respuesta inmune o el metabolismo que potencialmente conducen a la disminución en la capacidad regenerativa relacionada con la edad.

1.3.2. Los elementos repetitivos y el envejecimiento

Diversos estudios en ratones y otros organismos modelo han demostrado que los elementos transponibles activos contribuyen al proceso de envejecimiento (Van Meter *et al.*, 2014; H. Chen *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2016; De Cecco *et al.*, 2019), y tanto los elementos activos como los inactivos también se acumulan en los procesos y enfermedades neurodegenerativos relacionados con la edad (W. Li *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2018; LaRocca *et al.*, 2019; Saldi *et al.*, 2019). También, se ha descrito una activación transcripcional de los REs en células senescentes (Sedivy *et al.*, 2013). Además,

los transcritos de REs han sido implicados en la inflamación y el estrés oxidativo (Kreiling *et al.*, 2017), los cuales son dos contribuyentes clave al envejecimiento y las enfermedades con efectos positivos y negativos para la regeneración (Jaganjac *et al.*, 2022). Por ejemplo, un trabajo reciente con tejidos de humano y ratón muestra que los LINEs se activan con el envejecimiento y promueven la inflamación asociada a la senescencia, lo que convierte a la transcriptasa inversa del LINE-1, por ejemplo, en un objetivo farmacológico potencial para el tratamiento de los trastornos asociados a la edad (De Cecco *et al.*, 2019). Los mecanismos subyacentes por los cuales los transcritos de REs afectan estos procesos aún no están claros, pero podrían implicar la activación de respuestas inmunes innatas, que también desempeñan un papel central en la reparación y regeneración de tejidos, como se describió anteriormente (Moore *et al.*, 2021).

En este contexto, LaRocca *et al.* (2020) han reportado que los cambios en los niveles globales de transcritos de REs son un mejor marcador de la edad biológica que los genes codificantes de proteínas tanto en fibroblastos humanos (**Figura 1.9**) como en muestras de *Caenorhabditis elegans*. Una razón para esto podría ser que los cambios en la expresión de REs ocurren consistentemente y en la misma dirección, mientras que los patrones de expresión de genes codificantes pueden aumentar o disminuir de manera variable con los procesos relacionados con la edad (LaRocca *et al.*, 2020).

Actualmente, no se conocen los perfiles transcripcionales de los transposones en el ajolote. En consecuencia, el papel de los elementos repetitivos en la interacción entre el envejecimiento y la regeneración reparadora tampoco ha sido esclarecido. Sin embargo, hasta ahora la mayoría de los estudios se han centrado en genes codificantes conocidos y han pasado por alto el potencial papel regulatorio del material genético repetitivo, codificante y no codificante, el cual constituye la mayor parte de su genoma. En síntesis, es posible que en el ajolote la acumulación de transcritos de elementos transponibles causada por el envejecimiento sea un factor perjudicial para la regeneración de la extremidad.

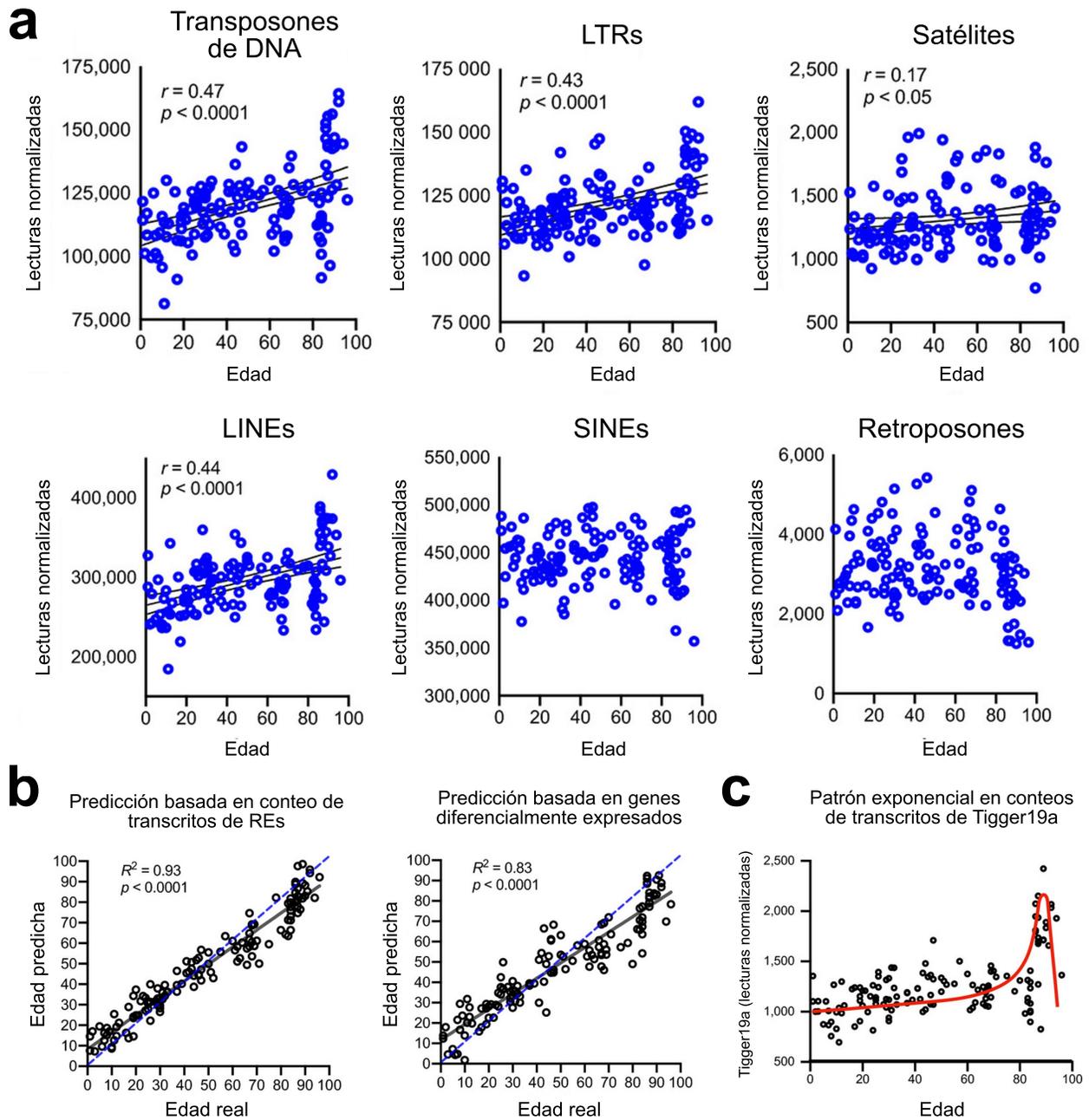


Figura 1.9. La acumulación de transcritos de elementos repetitivos (REs) relacionada con la edad permite predecir la edad del donante en fibroblastos humanos. (a) Correlaciones entre la edad y diferentes tipos de transcritos de REs. **(b)** Izquierda: regresión lineal que predice la edad real basándose en recuentos de transcritos de REs individuales (la línea discontinua azul representa una correlación perfecta entre la edad predicha y la edad real). Derecha: regresión lineal que predice la edad real en función de los 1200 genes con mayor expresión diferencial como efecto del envejecimiento. **(c)** Patrón exponencial en los conteos de transcritos de REs individuales con respecto a la edad en fibroblastos humanos (se muestra Tigger19a, el transposón más correlacionado con la edad). Figura adaptada y traducida desde LaRocca *et al.* (2020).

2. Planteamiento del problema

El ajolote tiene una de las mejores capacidades regenerativas entre los vertebrados, pudiendo reparar sus tejidos y partes corporales, incluyendo las extremidades. Sin embargo, estudios previos han reportado que su capacidad para reparar los tejidos de la extremidad disminuye con el envejecimiento. Se han propuesto muchos procesos subyacentes a este deterioro relacionado con el aumento en la edad, incluidos los cambios en los factores circulantes, las hormonas, la respuesta inmune o el metabolismo. En particular, el control de la senescencia celular y los procesos inmunes como la inflamación juegan un papel esencial tanto en la regeneración de la extremidad como con el envejecimiento, lo que sugiere la presencia de vías moleculares compartidas. Sin embargo, las causas de la disminución en sus capacidades regenerativas como efecto de la edad no han sido esclarecidas. Hasta ahora, la mayoría de los estudios realizados en esta salamandra se han centrado en las funciones de los genes codificantes de proteínas y han ignorado el potencial regulador de los elementos transponibles que constituyen casi el 65 % de su genoma. Además de afectar de manera directa la expresión de genes codificantes, los transposones generan intermediarios que modulan la respuesta inmune, la diferenciación celular y la senescencia. Tomando en cuenta su abundancia mayoritaria en el genoma del ajolote y sus potenciales efectos negativos en otros organismos, se ha hipotetizado que el proceso de regeneración de la extremidad necesita de una supresión de la actividad de los transposones para llevarse a cabo de manera correcta. Por otro lado, es posible que, como se ha reportado en otros modelos de envejecimiento, la expresión de los retrotransposones aumente con la edad en el ajolote, lo que podría contribuir a la disminución de las capacidades regenerativas. Con base en lo anterior, es necesario estudiar los perfiles de expresión de los transposones en el ajolote, tanto en tejidos en regeneración como en tejidos envejecidos, con el fin de entender su papel en el deterioro de las capacidades regenerativas como un efecto del envejecimiento del organismo.

3. Hipótesis

Los ajolotes adultos exhiben en el tejido regenerativo de la extremidad una mayor expresión de elementos repetitivos y una menor expresión de genes asociados con capacidades regenerativas que los ajolotes subadultos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Identificar las diferencias en la expresión de elementos repetitivos y genes entre tejidos de la extremidad regenerativa de ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) subadultos y adultos mediante análisis de datos de secuenciación de RNA.

4.2. Objetivos particulares

1. Identificar mediante análisis transcriptómicos los cambios en los perfiles de expresión y enriquecimiento de elementos repetitivos y genes durante la regeneración de la extremidad en ajolotes nativos (de Xochimilco).
2. Identificar mediante análisis transcriptómicos los cambios en los perfiles de expresión y enriquecimiento de elementos repetitivos y genes como efecto del envejecimiento en ajolotes nativos (de Xochimilco).
3. Comparar mediante análisis transcriptómicos los perfiles de expresión, coexpresión y enriquecimiento de elementos repetitivos y genes durante la regeneración en el ajolote, así como el efecto transcripcional del envejecimiento sobre el proceso regenerativo.

5. Métodos

5.1. Obtención de muestras biológicas de ajolotes nativos

Se obtuvieron muestras de tejido de *Ambystoma mexicanum*, cepa Xochimilco (Malacinski, 1978), genotipo *wild-type* (WT), de la colonia de la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC), Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM Xochimilco), Antiguo Canal Cuernavaca 3, Pista Olímpica Virgilio Uribe, Xochimilco, C.P. 16034, Ciudad de México, México. La colonia de *A. mexicanum* de la UMA, CIBAC se estableció en 2007 a partir de 31 organismos fundadores de origen silvestre, es decir, originarios de su hábitat en Xochimilco. Los investigadores encargados de la colonia han llevado a cabo una reproducción cuidadosa para evitar la endogamia (Divulgación de la Ciencia UAM-X, 2021). La UMA y la colonia fueron fundadas con la aprobación de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), México, bajo la clave de registro DGVS-CR-IN-0952-D.F./07.

El tamaño de muestra objetivo se determinó tomando como base la cantidad de réplicas biológicas necesaria para realizar un análisis de expresión diferencial de genes en el que se minimizaran los descubrimientos falsos y se aumentara el poder estadístico. Esto es, un experimento de RNA-seq con al menos seis muestras en cada grupo (Schurch *et al.*, 2016; D. Li *et al.*, 2022). En el caso de este trabajo, para determinar los genes y elementos repetitivos que se expresan diferencialmente durante la regeneración de la extremidad o el envejecimiento del ajolote, el muestreo implicaría extraer seis muestras de extremidad de subadultos, seis muestras de blastema de extremidad de subadultos, seis muestras de extremidad de adultos y seis muestras de blastema de extremidad de adultos. Sin embargo, considerando el estatus de peligro crítico de *A. mexicanum* (IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2019) y la pequeña cantidad de tejido y RNA que se puede extraer de un blastema de extremidad, se decidió reducir el número de muestras de subadultos a cinco por tipo de tejido. A su vez, en el caso de los ajolotes adultos, se decidió reducir el número de muestras de

extremidad a dos debido a la avanzada edad de los ejemplares, la posibilidad de que estos individuos no fueran capaces de regenerar la extremidad tras la amputación, y el efecto que esto pudiera tener en su bienestar. En los dos casos, para todos los grupos se mantuvo un número de muestras igual o superior a 2, el cual es el mínimo número de réplicas biológicas necesario para obtener estadísticos adecuados en un análisis de expresión diferencial de genes (Love *et al.*, 2014; Schurch *et al.*, 2016; D. Li *et al.*, 2022).

Todos los experimentos con especímenes de *A. mexicanum* del presente trabajo se realizaron con la aprobación (número de referencia: CEI.2023.007) del Comité de Ética en Investigación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS) de la UAM Xochimilco, de acuerdo con la legislación vigente y lineamientos establecidos por la SEMARNAT (NOM-059-SEMARNAT-2010, NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, NOM-033-SAG/ZOO-2014). El proyecto fue registrado ante la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA), Secretaría de Salud, México, bajo el número de referencia CONBIOÉTICA-09-CEI-017-20180924.

Los ajolotes fueron sedados mediante una inmersión en un tanque que contenía agua filtrada del humedal de Xochimilco y benzocaína a una concentración de 50 mg/L por 20 minutos antes del proceso de amputación. Utilizando un microscopio estereoscópico, se recolectaron meticulosamente muestras biológicas de los metatarsos de las extremidades (posteriores) de cinco ajolotes machos de 8 meses de edad (subadultos), así como de dos ajolotes machos de 8 años de edad (adultos). Diez días después de la amputación, se extrajeron tejidos de blastema únicamente de los cinco ajolotes subadultos, ya que ninguno de los adultos mostró desarrollo de blastema incluso después de seis meses de monitoreo. En total, se obtuvieron 12 muestras de tejido: dos de extremidades de adultos, cinco de extremidades de subadultos y cinco de blastemas de extremidad de subadultos. No se sacrificó ningún animal para los fines de este estudio y todos los ajolotes fueron reintroducidos de manera segura en su hábitat en la UMA, CIBAC luego de la recolección final de muestras.

5.2. Extracción y secuenciación de RNA

Los tejidos recolectados se conservaron en solución RNAlater (Invitrogen, Massachusetts, EE. UU.) a 4 °C durante un máximo de 24 horas antes de su procesamiento. El RNA fue extraído por Karla M. Torres Arciga y Michel Montalvo Casimiro en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Ciudad de México, México, siguiendo el protocolo establecido por Chomczynski y Sacchi (1987). Brevemente, el tejido embebido en RNAlater fue cortado con bisturí y homogeneizado con pistilo en TRIzol Reagent (Invitrogen, California, EE. UU.). Una vez homogeneizado el material, se añadió cloroformo y se separaron en fase orgánica y acuosa. Posteriormente, se tomó la fase acuosa y se precipitó con isopropanol, seguido de lavados con etanol. Finalmente, se resuspendió en agua libre de nucleasas. La calidad de las muestras de RNA se evaluó mediante High Sensitivity RNA TapeStation (Agilent Technologies Inc., California, EE. UU.) y se cuantificó mediante el ensayo Qubit 2.0 RNA HS (ThermoFisher, Massachusetts, EE. UU.). El resumen de la calidad de las muestras de RNA extraídas se presenta en el **Cuadro A.1**.

La preparación de las bibliotecas y su posterior secuenciación fueron realizadas a través de CD Genomics (Nueva York, EE. UU.) siguiendo el protocolo descrito a continuación. El RNA ribosómico en las muestras se disminuyó utilizando el kit RiboZero Gold (Illumina, California, EE. UU.). El RNA reducido en rRNA se purificó con 2× perlas RNAClean XP Beads (Beckman Coulter, California, EE. UU.) y se eluyó en agua libre de nucleasas. La construcción de la biblioteca se realizó según las recomendaciones del fabricante para el kit SmarterStranded V2 (Takara Bio, California, EE. UU.). La cantidad final de la biblioteca de DNA se midió mediante KAPA SYBR FAST qPCR y su calidad se evaluó con TapeStation D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, California, EE. UU.). Se utilizaron índices duales Illumina 8-nt (Illumina, California, EE. UU.). La combinación equimolar de bibliotecas se realizó en función de los valores de control de calidad. Finalmente, se llevó a cabo una secuenciación de extremos emparejados (*paired-end* o PE) en un secuenciador Illumina HiSeq (Illumina, California, EE. UU.) con una configuración de longitud de lectura de 150 pb y 20 millones de lecturas por muestra. Los datos de RNA-seq crudos se depositaron en el Gene

Expression Omnibus (GEO) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) bajo el ID de acceso GSE237864 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE237864>).

5.3. Incorporación de datos de RNA-seq externos

Además de los 12 conjuntos de datos de RNA-seq de las muestras de ajolotes nativos recopiladas en este trabajo, también se integraron en el análisis 124 muestras de RNA-seq de estudios publicados anteriormente: GSE92429 (D. M. Bryant, Johnson *et al.*, 2017), PRJNA378982 (Nowoshilow *et al.*, 2018), PRJNA354434 (Caballero-Pérez *et al.*, 2018), y GSE182746 (Ye *et al.*, 2022). Según los metadatos disponibles en las bases de datos, para cada una de las muestras se determinó si esta correspondía a un tejido distinto a la extremidad (*no extremidad*), a un tejido de extremidad (*extremidad*), o a un blastema de extremidad (*blastema*). Adicionalmente, a cada muestra se le asignó un grupo de edad (*adulto* o *subadulto*). Para las muestras para las cuales no había un grupo de edad descrito de entre estos dos, el grupo de edad se asignó con base en la edad de maduración sexual reportada para el ajolote (Vieira *et al.*, 2020). Es decir, los ajolotes machos de 9 meses de edad o menos y las hembras de 12 meses de edad o menos fueron designados como *subadultos*; los ajolotes de mayor edad fueron designados como *adultos*. Los metadatos de todos los datos analizados se presentan en el **Cuadro B.1**.

5.4. Análisis bioinformático

Todos los procedimientos descritos a continuación (**Figura 5.1**) y el código subyacente a los análisis bioinformáticos de los datos de RNA-seq nativos y externos se encuentran detallados en el siguiente repositorio de GitHub: <https://github.com/samuelruizperez/axoloTE>. Los conjuntos de datos resultantes de los siguientes análisis, incluyendo tablas de conteos, anotaciones, y demás información suplementaria están disponibles en el siguiente repositorio de Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10728952>.

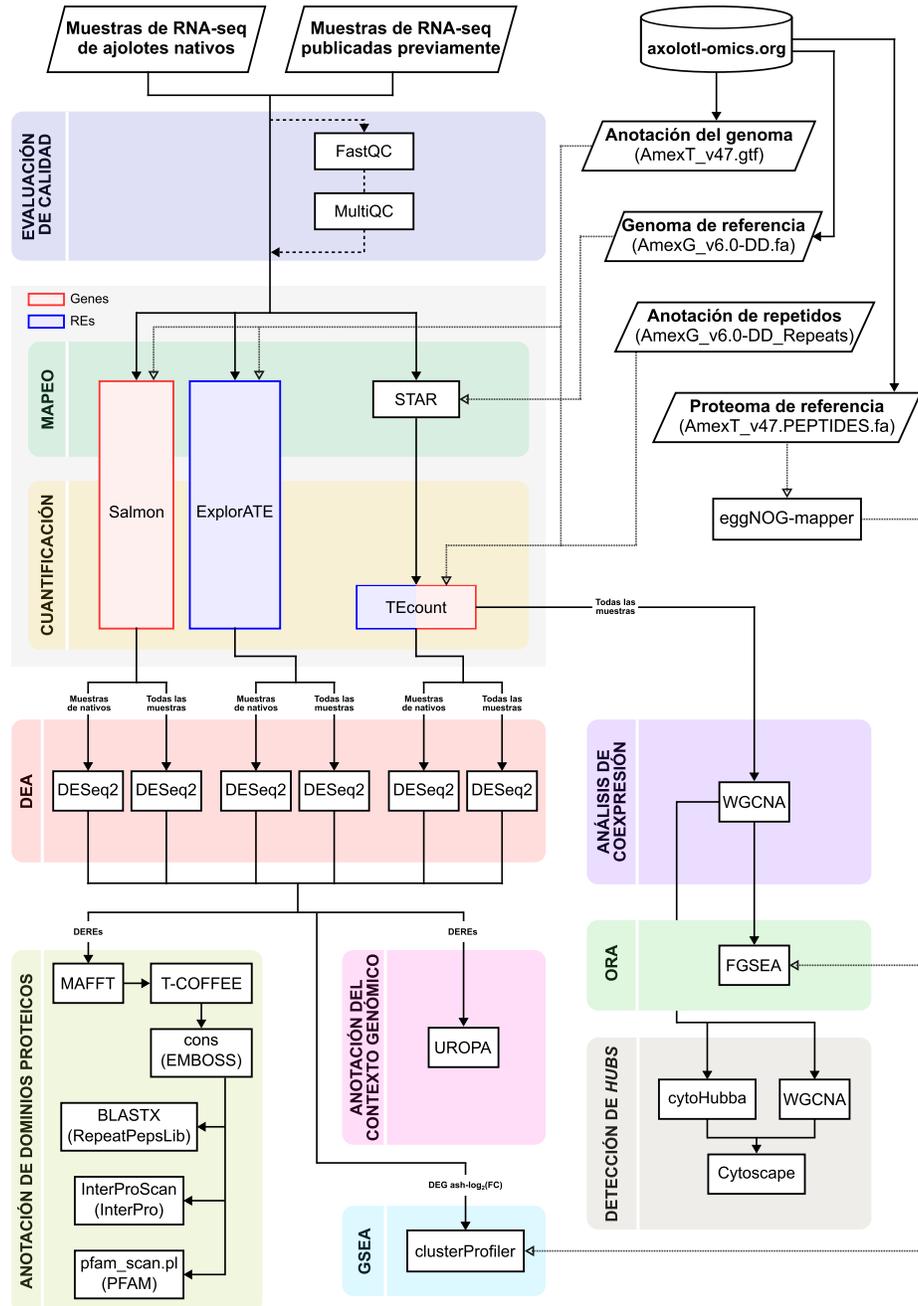


Figura 5.1. Diagrama de flujo de los métodos bioinformáticos utilizados para analizar las muestras de RNA-seq en esta tesis. Se analizaron muestras de secuenciación de RNA de ajolote publicadas anteriormente y muestras de ajolotes nativos (este estudio) siguiendo dos enfoques de cuantificación distintos tanto para genes como para elementos repetitivos. Se incluyen pasos de expresión diferencial, enriquecimiento y coexpresión, así como la anotación de determinados elementos genómicos. RE: elemento repetitivo; DEA: análisis de expresión diferencial; DERE: RE expresado diferencialmente; DEG: gen expresado diferencialmente; GSEA: análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes; ORA: análisis de sobrerepresentación; $\text{ash-log}_2(\text{FC})$: tasa de cambio logarítmica (*log fold change*) encogida por *adaptive shrinkage*.

5.4.1. Anotación funcional del proteoma y descarga de anotaciones genómicas del ajolote

Con el objetivo de mejorar la completitud y calidad de la anotación de las secuencias codificantes en el genoma del ajolote y facilitar la interpretación funcional de los análisis de RNA-seq siguientes, el genoma de referencia del ajolote (AmexG_v6.0-DD), el transcriptoma (AmexT_v47-AmexG_v6.0-DD), el proteoma (AmexT_v47_protein) y sus anotaciones se descargaron desde <https://www.axolotl-omics.org/assemblies> (Nowoshilow *et al.*, 2018). Las secuencias codificantes del archivo del proteoma se anotaron funcionalmente utilizando eggNOG-mapper 2.1.12 (Cantalapiedra *et al.*, 2021) con base en los datos de ortología de eggNOG 5.0 (Huerta-Cepas *et al.*, 2019). En concreto, las búsquedas de secuencias se realizaron con DIAMOND 2.1.8 (Buchfink *et al.*, 2021) en modo ultrasensible, y los perfiles resultantes se realinearon con HMMER 3.3.2 («HMMER 3.3.2», 2020) a los dominios PFAM (Mistry *et al.*, 2021) encontrados en los grupos ortólogos. Finalmente, se generó una lista de las posiciones de los dominios en las secuencias consultadas.

Con base en las anotaciones publicadas por Nowoshilow *et al.* (2018) y los resultados de la anotación con eggNOG-mapper, las secuencias en el archivo de anotación del transcriptoma (AmexT_v47-AmexG_v6.0-DD) se reanotaron funcionalmente en los términos de Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathways y NCBI/Entrez Gene IDs. Para ello, se consultaron los *transcript_name* (nombres/símbolos de transcrito) contra las anotaciones disponibles del genoma de humano (org.Hs.eg.db, M. Carlson, 2019a), ratón (org.Mm.eg.db, M. Carlson, 2019b) y *Xenopus* (org.Xl.eg.db, M. Carlson, 2019c). Aquellos *transcript_name* con el identificador [*hs*] (de *Homo sapiens*) se consultaron en org.Hs.eg.db, y aquellos con [*nr*] (de la base de datos no redundante del NCBI) o sin identificador se consultaron en org.Hs.eg.db, org.Mm.eg.db y org.Xl.eg.db. Todas las coincidencias resultantes de estas consultas se fusionaron, se eliminaron los duplicados y a cada transcrito se le asignó un nuevo conjunto de términos de GO, KEGG Pathways y NCBI gene IDs. Luego, para resumir las anotaciones a nivel de gen, la anotación de todos los transcritos se agrupó por *gene_id* (identificador de gen), se eliminaron los duplicados y a cada gen

se le asignó un nuevo conjunto de de términos de GO y KEGG Pathways. Además, a cada gen se le asignó un *gene_name* (símbolo de gen) seleccionando uno de la lista de *transcript_name(s)* anotados para el gen, con la siguiente prioridad: 1) primer *transcript_name* con identificador [*hs*], 2) primer *transcript_name* anotado por eggNOG-mapper, 3) primer *transcript_name* con identificador [*nr*], y 4) primer *transcript_name* sin identificador. En los casos en los que no se pudo generar ningún *transcript_name* para un gen, ya fuese porque el campo estaba vacío, o porque fuera "DESCONOCIDO", "N/A." "no disponible", se copió el *gene_id* al *gene_name* (nombre/símbolo de gen).

La biblioteca de elementos repetitivos de referencia del ajolote (AmexG_v6.0-DD_Repeats) se recuperó del UCSC Genome Browser (Kent *et al.*, 2002). En concreto, se utilizó la herramienta UCSC Table Browser (Karolchik *et al.*, 2004; Raney *et al.*, 2014) para consultar el *track data hub* https://www.axolotl-omics.org/trackhubs/AmexG_v6.0-DD/Repeats/hub.description, el cual contiene las anotaciones de elementos repetitivos del ajolote bajo el dominio <https://genome.axolotl-omics.org> (Nowoshilow *et al.*, 2018). La biblioteca se descargó en formato de RepeatMasker (.out) y se convirtió a *Gene transfer format* o GTF (AmexG_v6.0-DD_Repeats.gtf) con el programa *makeTEgtf.pl* disponible en el repositorio de Tetranscripts 2.2.3 (https://labshare.cshl.edu/shares/mhammellab/www-data/Tetranscripts/TE_GTF/makeTEgtf.pl.gz [2023-09-14]) (Jin *et al.*, 2015).

Adicionalmente, se generó *de novo* una biblioteca de elementos repetitivos del genoma del ajolote (AmexG_v6.0-DD) para su uso en trabajos futuros, ya que, a pesar de que la biblioteca generada por Nowoshilow *et al.* (2018) es suficiente para la presente tesis, el proceso que siguieron para generarla no se encuentra documentado en detalle. Además, la misma biblioteca no es de acceso libre, lo cual limita la reproducibilidad de posteriores análisis. En el **Apéndice C** se detalla el procedimiento seguido para generar la biblioteca de elementos repetitivos *de novo*.

5.4.2. Análisis de datos de secuenciación de RNA

La calidad de los conjuntos de datos de RNA-seq se evaluó con FastQC 0.12.1 (Andrews, 2010) y se resumió con MultiQC 1.19 (Ewels *et al.*, 2016).

Posteriormente, utilizando las lecturas crudas, se cuantificó la expresión de genes y elementos repetitivos siguiendo dos métodos independientes. Bajo el primer método, todas las muestras de RNA-seq se alinearon al genoma de referencia del ajolote (AmexG_v6.0-DD) usando STAR 2.7.11a (Dobin *et al.*, 2013) con parámetros `-outFilterMultimapNmax 200 -winAnchorMultimapNmax 400 -outFilterMismatchNoverLmax 0.04 -outFilterType BySJout`. Luego, utilizando los archivos de alineamiento resultantes, se cuantificó la expresión de genes y subfamilias de elementos repetitivos utilizando TEcount, implementado en Tetranscripts 2.2.3 (Jin *et al.*, 2015), con los parámetros `-stranded no -mode multi` y las anotaciones de referencia de transcritos (AmexT_v47-AmexG_v6.0-DD) y elementos repetitivos (AmexG_v6.0-DD_Repeats). Después, los resultados de la cuantificación de todas las muestras se unieron e importaron como una matriz de conteos para posteriores análisis. Bajo el segundo método, primero se realizó la cuantificación de la expresión de transcritos (AmexT_v47-AmexG_v6.0-DD) en todas las muestras utilizando Salmon 1.10.2 (Patro *et al.*, 2017) y después se empleó ExplorATE v0.1b (Femenias *et al.*, 2022) para cuantificar la expresión de los loci de elementos repetitivos (AmexG_v6.0-DD_Repeats). Luego, se utilizó tximport 1.26.0 (Soneson *et al.*, 2016) para unificar los valores de abundancia de transcritos de todas las muestras generados por Salmon y resumirlos a nivel de expresión génica. De manera independiente, se utilizó tximport para importar las abundancias de loci de elementos repetitivos generadas por ExplorATE y resumirlas al nivel de subfamilia.

5.4.2.1. Análisis de expresión diferencial de genes y elementos repetitivos

Los datos de cuantificación importados previamente se analizaron para determinar la expresión diferencial utilizando DESeq2 1.38.0 (Love *et al.*, 2014) con dos diseños estadísticos diferentes. En el primer diseño, solo se analizaron las 12 muestras de ajolotes nativos bajo un modelo aditivo $\sim \text{Grupo_de_edad} + \text{Tejido}$. En el segundo diseño, tanto las muestras nativas de este trabajo como las muestras publicadas previamente se analizaron bajo un modelo de interacción que además considerase el efecto del lote $\sim \text{Lote} + \text{Grupo_de_edad} + \text{Grupo_de_tejido} + \text{Grupo_de_edad}:\text{Grupo_de_tejido}$. De esta manera, se realizaron pruebas de significancia de Wald de dos colas basadas en umbral de tasa de cambio logarítmica o *logarithmic fold change* (LFC) utilizando los parámetros

altHypothesis = "greaterAbs", *lfcThreshold* = $\log_2(1.5)$. Posteriormente, se empleó el método de ponderación de hipótesis independientes implementado en el paquete IHW 1.26.0 (Ignatiadis *et al.*, 2016) para realizar un filtrado independiente de aquellas pruebas de hipótesis que tuvieran poca o ninguna probabilidad de mostrar evidencia significativa y, a su vez, ajustar los valores de p correspondientes a cada gen. En esta ponderación se utilizó como parámetro un límite de significancia $\alpha = 0.05$. Adicionalmente, los valores de LFC se redujeron mediante encogimiento adaptativo o *adaptive shrinkage* (ash) (Stephens, 2017) con el parámetro *lfcThreshold* = $\log_2(1.5)$. Finalmente, se determinaron como genes diferencialmente expresados (DEG) o subfamilias de elementos repetitivos diferencialmente expresadas (DEREs) a aquellos que bajo las pruebas de significancia presentaron un $|\text{ash-log}_2(FC)| > \log_2(1.5)$ y un IHW-adj $p < 0.05$. Es decir, aquellos genes o elementos repetitivos con valores de p ajustados menores a 0.05 y valores de LFC encogido mayores a $\log_2(1.5)$ o menores a $-\log_2(1.5)$ se consideraron sobreexpresados o subexpresados, respectivamente. Dado que se utilizaron dos métodos de cuantificación tanto para la expresión de genes como para la expresión de elementos repetitivos, los hallazgos provenientes del análisis de expresión diferencial descritos en la sección de resultados de este trabajo se presentan como rangos; por ejemplo, «se identificaron de 2 a 6 genes regulados negativamente...».

Los resultados de las pruebas de expresión diferencial se visualizaron en gráficos de volcán y mapas de calor, y las combinaciones o intersecciones entre los conjuntos de DEGs o DEREs de todos los contrastes se resumieron en gráficos *UpSet*. Los gráficos de volcán se generaron con EnhancedVolcano 1.16.0 (Blighe *et al.*, 2023) y se personalizaron con ggplot2 3.4.4 (Wickham, 2016). Los mapas de calor y los gráficos *UpSet* de este y el resto de análisis se generaron con ComplexHeatmap 2.14.0 (Gu *et al.*, 2016).

5.4.2.2. Anotación del contexto genómico de elementos repetitivos diferencialmente expresados

Posteriormente, para determinar la coocurrencia o proximidad de los loci de DEREs con respecto a los DEGs, se realizó un análisis de contexto genómico con UROPA 4.0.3 (Kondili *et al.*, 2017). Las coordenadas genómicas de cada loci de las DEREs se extrajeron del archivo de anotación de

elementos repetitivos del ajolote (AmexG_v6.0-DD_Repeats). Luego, se determinaron los elementos genómicos/génicos más cercanos a estas coordenadas con base en lo registrado en la anotación del transcriptoma (AmexT_v47-AmexG_v6.0-DD). Para evitar que un locus de DERE fuera asociado con más de un elemento genómico distinto, la búsqueda se realizó con la siguiente prioridad:

- 1) promotor-sitio de inicio de la transcripción (TSS) inferido: -1000 pb, +100 pb del extremo 5' del gen;
- 2) sitio de término de la transcripción (TTS) inferido: -100 pb, +1000 pb del extremo 3' del gen;
- 3) secuencia codificante (CDS);
- 4) región no traducida 5' (5'-UTR);
- 5) región no traducida 3' (3'-UTR);
- 6) región exónica (exónico);
- 7) región intrónica (intrónico);
- 8) otra región intragénica (otro génico);
- 9) 5 kb río arriba del gen (-5 kb);
- 10) 5 kb río abajo del gen (+5 kb);
- 11) 10 kb río arriba del gen (-10 kb);
- 12) 10 kb río abajo del gen (+10 kb);
- 13) 50 kb río arriba del gen (-50 kb);
- 14) 50 kb río abajo del gen (+50 kb);
- 15) región intergénica.

5.4.2.3. Anotación de los dominios proteicos de elementos repetitivos diferencialmente expresados

Para determinar los dominios proteicos presentes en las secuencias de los elementos repetitivos diferencialmente expresados y potencialmente mejorar la clasificación de elementos desconocidos, se realizó una búsqueda de las secuencias consenso de cada subfamilia en tres bases de datos de proteínas de manera independiente. Primero, la biblioteca de elementos repetitivos (AmexG_v6.0-DD_Repeats.gtf) se convirtió a formato BED con el programa *gtf2bed* implementado en BEDOPS 2.4.41 (Neph *et al.*, 2012). Luego, el formato BED se utilizó como referencia para extraer las secuencias nucleotídicas en formato FASTA de todos los loci de elementos repetitivos diferencialmente expresados, utilizando BEDTools *getfasta* 2.31.1 (Quinlan y Hall, 2010). Posteriormente, las

secuencias de cada subfamilia de loci se alinearon con MAFFT v7.520 (Nakamura *et al.*, 2018) para generar archivos de alineamiento de múltiples secuencias (MSA) en formato FASTA. En cada MSA, las columnas con 80% o más de espacios en blanco (*gaps*) se eliminaron con la opción *+rm_gap 80* de T-COFFEE 13.46.0.919e8c6b (Notredame *et al.*, 2000). Después, con los MSAs editados y la función *cons -plurality 1* del paquete EMBOSS 6.6.0 (Rice *et al.*, 2000) se generaron las secuencias consenso de cada una de las subfamilias de elementos repetitivos.

El siguiente paso consistió en traducir las secuencias de nucleótidos consenso. Para ello, se siguieron dos métodos implementados en funciones del paquete EMBOSS. El primer método implicó obtener la colección de marcos de lectura abiertos (ORFs) usando la función *getorf*, manteniendo únicamente aquellos tramos de DNA que tuvieran una longitud mínima de 200 aminoácidos sin un codón de paro. Las traducciones resultantes se importaron al programa *pfam_scan.pl* 1.6 para buscar dominios de proteínas conservados que estuvieran catalogados en la base de datos PFAM 36.0 (Mistry *et al.*, 2021). El segundo método consistió en traducir la secuencia de nucleótidos consenso con la función *transeq* de EMBOSS, produciendo la traducción de los seis marcos de lectura posibles al ignorar cualquier codón de paro intermedio. Las traducciones resultantes también se consultaron en PFAM con *pfam_scan.pl*.

Independientemente, las secuencias consenso se consultaron con BLASTX 2.15.0 (Camacho *et al.*, 2009) contra la base de datos *RepeatPeps.lib*, distribuida con RepeatMasker (Smit *et al.*, 2013).

Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos que resultaron de la traducción de los consensos se consultaron con InterProScan 5.66 (Jones *et al.*, 2014) en la base de datos de dominios y familias proteicas InterPro 98.0 (Paysan-Lafosse *et al.*, 2023).

5.4.2.4. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes basado en expresión diferencial

A continuación, se determinaron los procesos o vías biológicas enriquecidos en cada contraste. Para ello, las listas completas de los valores de $-\log_2(\text{FC})$ que resultaron de cada contraste del análisis

de expresión diferencial se sometieron a un análisis rápido de enriquecimiento de conjuntos de genes (FGSEA) (Korotkevich *et al.*, 2021), el cual está implementado en la función *GSEA* de clusterProfiler 4.6.0 (T. Wu *et al.*, 2021). Para este análisis se utilizaron los parámetros $exponent = 1$, $minGSSize = 10$, $maxGSSize = 500$, $eps = 0$, $pvalueCutoff = 0.05$, $pAdjustMethod = "BH"$, $nPermSimple = 1000000$, y las anotaciones funcionales generadas previamente, incluyendo los datos de Gene Ontology (GO) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathways.

5.4.2.5. Análisis de coexpresión de genes y elementos repetitivos

Los conteos de expresión de genes y elementos repetitivos provenientes de TEcount se sometieron a un ajuste del efecto por lotes o *batch effect* con ComBat-seq (Y. Zhang *et al.*, 2020), implementado en sva 3.46.0 (Leek *et al.*, 2012), especificando el grupo de edad y el grupo de tejido como covariables biológicas de interés para preservar su señal en los datos ajustados. Los conteos ajustados se normalizaron con la transformación estabilizadora de la varianza o *variance stabilizing transformation* (VST) de DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Los conteos normalizados se emplearon en un análisis de coexpresión con el paquete de R de análisis de redes de correlación ponderada o *weighted correlation network analysis* (WGCNA) v1.71 (Langfelder y Horvath, 2008). Para calcular la matriz de adyacencia a_{ij} de la red con signo ($a_{ij} = \left| \frac{1 + \text{cor}(x_i, x_j)}{2} \right|^\beta$), la similitud de coexpresión se elevó a una potencia de umbral suave de $\beta = 8$, que fue elegida con base en el criterio de topología libre de escala aproximada (B. Zhang y Horvath, 2005) implementado en la función *pickSoftThreshold* de WGCNA, es decir, esta fue la potencia más baja para la cual el índice de ajuste de topología libre de escala R^2 superó 0.85. Posteriormente, se utilizó la matriz de adyacencia para calcular la matriz de solapamiento topológico o *topological overlap matrix* (TOM) y se agruparon los genes y elementos repetitivos en módulos de coexpresión con base en la similitud TOM. Para ello, se empleó la función *blockwiseModules* de WGCNA, que integra en un solo paso la construcción de redes y la detección y agrupamiento de módulos consenso. Los parámetros ingresados en esta función fueron $power = 8$, $networkType = "signed"$, $deepSplit = 2$, $pamRespectsDendro = F$, $minModuleSize = 30$, $reassignThreshold = 0$, $mergeCutHeight = 0.25$, $maxBlockSize = 52000$. Específicamente, el parámetro *maxBlockSize* se ajustó a 52000 para permitir la construcción de redes en un solo bloque.

La matriz TOM se convirtió en matriz de distancia y se elevó a una potencia $((1 - TOM)^7)$ para hacer que las conexiones moderadamente fuertes fueran más visibles. El mapa de calor de la matriz transformada y el dendrograma de los módulos de coexpresión se generaron con la función *TOMplot* de WGCNA.

Luego, para identificar los módulos significativamente asociados con los fenotipos de interés (grupo de edad o tejido), se correlacionaron los eigengenes de los módulos con los fenotipos utilizando la función *cor* (Pearson) de WGCNA. Después, se generó el vector de valores *p* de la misma longitud que las correlaciones de entrada utilizando la función *corPvalueStudent* de WGCNA, y se ajustaron con el método de Benjamini-Hochberg (1995). Estos valores se graficaron en un mapa de calor de correlación entre módulos y fenotipos con *ComplexHeatmap*.

Finalmente, se cuantificaron las asociaciones de cada gen con el fenotipo de interés usando la medida de significancia génica (GS), que se define como el valor absoluto de la correlación entre el gen y el fenotipo (Langfelder y Horvath, 2008). Además, para cada gen, también se empleó una medida cuantitativa de su pertenencia al módulo (membresía intramodular o MM), la cual se define como la correlación del perfil de expresión del gen y el eigengen de su módulo. Estas dos medidas se utilizaron en gráficos de correlación para identificar los genes/REs con mayor asociación a un fenotipo y a la vez la mayor pertenencia a (o importancia para) su módulo.

5.4.2.6. Análisis de enriquecimiento en módulos de coexpresión

El enriquecimiento de vías biológicas en cada módulo de coexpresión se determinó con un análisis de sobrerrepresentación basado en la prueba hipergeométrica, tal como se implementa en la función *fgseaORA/fora* de FGSEA 1.24.0 (Korotkevich *et al.*, 2021). La anotación de Gene Ontology (GO) generada previamente se utilizó para producir una lista específica del ajolote de términos de GO y sus correspondientes genes miembro para usar como referencia. El enriquecimiento de cada módulo se analizó de forma independiente: el conjunto de genes de consulta se definió como todos los genes miembros del módulo, es decir, los detectados por WGCNA, y el universo/fondo/*background* génico se definió como el conjunto de genes para los cuales al menos 3 muestras de cualquiera de los

fenotipos (Grupo de edad o tejido) que estaban significativamente correlacionados con el módulo (BH-adj $p < 0.05$) tenían un conteo de TEcount crudo de al menos 10. Solo los conjuntos de genes enriquecidos con mínimo 10 y máximo 500 genes fueron incluidos en la prueba.

5.4.2.7. Detección de genes y elementos repetitivos centrales (*hub*)

Los genes o elementos repetitivos centrales/eje/*hub* de los módulos de coexpresión se identificaron utilizando dos métodos de ordenamiento distintos:

Bajo el primer método, se utilizó una versión modificada de la función *ChooseTopHubInEachModule* del paquete WGCNA para identificar los cuatro genes con la mayor conectividad en cada módulo, tomando en cuenta todos los genes en la matriz de expresión.

En el segundo método, la TOM de cada módulo de coexpresión se ingresó en la función *exportNetworkToCytoscape* del paquete WGCNA para exportar su correspondiente red a archivos de nodos (genes/REs) y aristas (adyacencias/pesos). Se utilizó un filtro de adyacencia $a_{ij} > 0.02$ para mantener las aristas de cada red. Los nodos y aristas generados se importaron a Cytoscape 3.10.1 (Shannon *et al.*, 2003) y los 20 principales genes/REs *hub* de cada módulo se identificaron en función de su *maximal clique centrality* (MCC), calculada con el complemento cytoHubba 0.1 (Chin *et al.*, 2014).

Los conjuntos de genes/REs resultantes de la uniones de ambos métodos de ordenamiento se utilizaron para generar nuevas redes sobre las que posteriormente se aplicaron los siguientes algoritmos para mejorar su visualización: *edge-weighted spring embedded layout* (basado en el peso/TOM), *yFiles* (v1.1.3) *Remove Overlaps* y *yFiles* (v1.1.3) *Organic Edge Router* (Wiese *et al.*, 2004; yWorks GmbH, 2023). A continuación, se utilizó Cytoscape StringApp 2.0.2 (Doncheva *et al.*, 2019) para recuperar las asociaciones proteicas físicas y funcionales (con una puntuación de confianza ≥ 0.4) entre los genes *hub* identificados, consultando la base de datos STRING (Szklarczyk *et al.*, 2019, 2021), y finalmente anotando las asociaciones en las redes manualmente.

6. Resultados

6.1. Análisis de muestras de RNA-seq de ajolotes nativos

6.1.1. La expresión diferencial de genes durante la regeneración

Para determinar los genes que se expresan diferencialmente durante la formación del blastema de la extremidad, se extrajeron muestras de RNA de la amputación de una extremidad posterior de cinco ajolotes subadultos (de 8 meses) y dos adultos (de 8 años). Diez días después de la amputación, se recolectaron tejidos de blastema solo de los cinco ajolotes subadultos, ya que ninguno de los ajolotes adultos mostró desarrollo de tejido regenerativo (**Figura 6.1**). Después de la extracción, las muestras se sometieron a RNA-seq, y se cuantificaron y analizaron sus niveles de expresión siguiendo dos métodos distintos (ver **Métodos**).

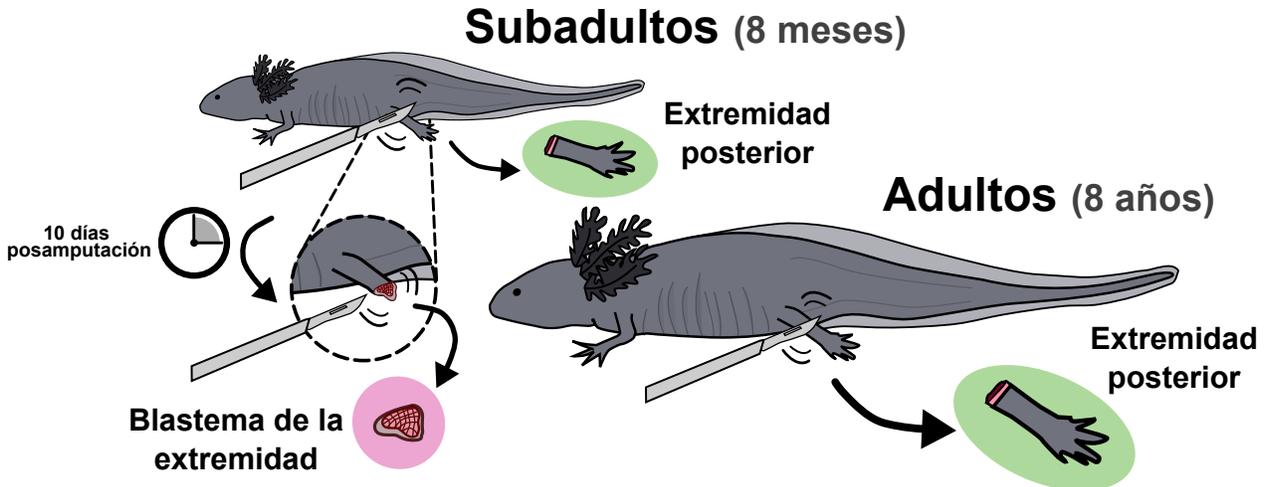


Figura 6.1. Representación gráfica del muestreo de tejido de ajolotes nativos. El muestreo consistió en cinco amputaciones de extremidades y cinco blastemas (10 días posamputación) de especímenes subadultos (8 meses de edad), y dos amputaciones de extremidades de especímenes adultos (8 años de edad).

Para evaluar la similitud entre las muestras de tejido extraídas y determinar si los conteos de lecturas se ajustaban a las expectativas del diseño del experimento, se visualizaron las distancias entre las muestras mediante un análisis de correlación y un análisis de componentes principales

6. Resultados

(PCA) (**Figura 6.2**). En un PCA, los datos de las muestras se proyectan en un plano 2D que permite identificar las dos direcciones que explican la mayoría de sus diferencias (X. Chen *et al.*, 2020). El PCA de los recuentos de expresión normalizados reveló la presencia de dos subgrupos subyacentes al conjunto de datos, correspondientes a los dos tipos de tejido: extremidad y blastema de extremidad. Uno de los tejidos de extremidad de ajolote subadulto (SA-L4) resultó ser el más distante con base en su correlación de Pearson, sobre todo con respecto a dos blastemas de subadultos (SA-B3 y SA-B1). En términos generales, estas previsualizaciones mostraron que la mayor parte de la variación entre las muestras secuenciadas se debió a las diferencias entre el blastema y el tejido de la extremidad, mientras que las diferencias por el envejecimiento fueron menos notorias.

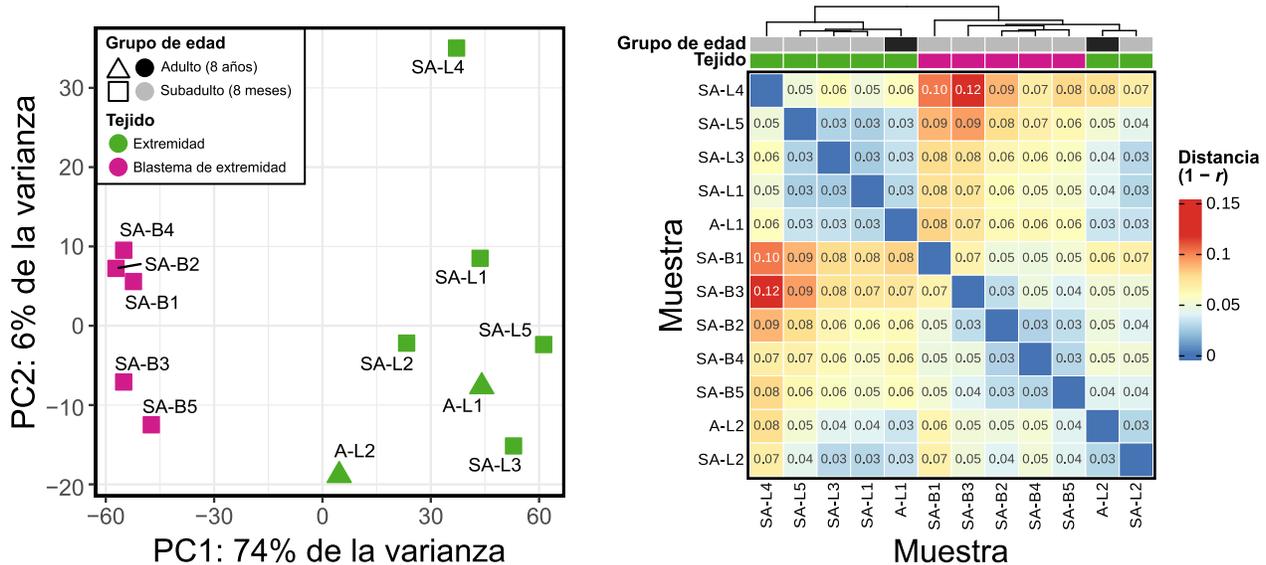


Figura 6.2. Previsualización de la calidad y agrupamiento de los conteos de genes y elementos repetitivos (REs) en ajolotes nativos. Izquierda: gráfico de análisis de componentes principales (PCA) basado en los conteos transformados de genes y elementos repetitivos. **Derecha:** mapa de calor de distancias entre muestra y muestra. r es el coeficiente de correlación de Pearson. SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema.

Luego, para identificar individualmente aquellos genes con una tasa de cambio significativa entre los dos tejidos, es decir, durante la formación del blastema, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial (DEA). Este análisis reveló que 971-1095 de los genes expresados diferencialmente (DEGs) en el contraste entre el blastema y la extremidad estaban regulados a la baja, y 131-180 genes estaban regulados al alza (**Figura 6.3a**). Es importante destacar que, en total, de entre todos los contrastes, 213 genes no están anotados en el genoma de referencia de *A. mexicanum*

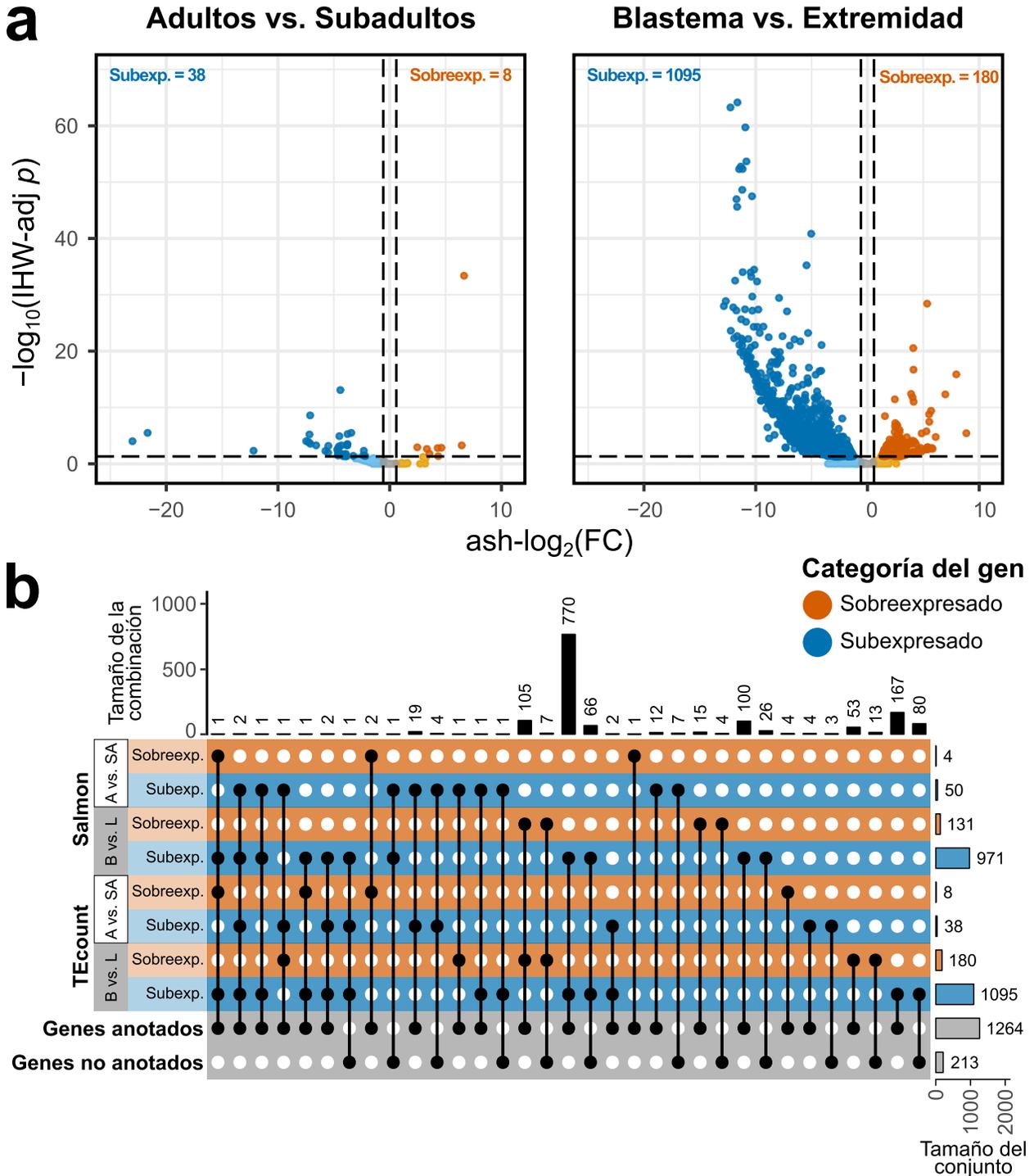


Figura 6.3. Expresión diferencial de genes durante la regeneración y el envejecimiento en ajolotes nativos. (a) gráficos de volcán de las diferencias en la expresión de genes entre muestras de ajolotes adultos y subadultos y entre muestras de blastema y extremidad. Los genes significativamente sobreexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) > \log_2(1.5)$, IHW-adj $p < 0.05$) o subexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) < -\log_2(1.5)$, IHW-adj $p < 0.05$) están representados por puntos de color naranja oscuro y azul oscuro, respectivamente. (b) gráfico *UpSet* del total de genes diferencialmente expresados detectados para cada método de cuantificación y contraste, sus distintas combinaciones y su estado de anotación. SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema.

v6.0-DD (**Figura 6.3b**). A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (FGSEA) para identificar qué funciones o procesos biológicos fueron enriquecidos entre todos los genes anotados. En concordancia con los resultados del DEA, el contraste entre blastema y extremidad mostró una predominante regulación negativa a nivel del proceso, con la supresión de 598 términos GO y 47 vías KEGG y una menos numerosa activación de 303 términos GO y 17 vías KEGG (**Figura 6.4**). Los términos reprimidos están asociados principalmente con las vías relacionadas con el desarrollo, la diferenciación y la contracción musculares, además del ensamblaje, la organización y la señalización de los componentes del músculo. Además, los componentes y la señalización de la matriz extracelular, y las uniones celulares, también se vieron suprimidos en el tejido regenerativo. Por el contrario, los procesos activados en el blastema se relacionaron en su mayoría con componentes y procesos ribosómicos, traducción, catabolismo del mRNA y direccionamiento de proteínas.

6.1.2. La expresión diferencial de genes como efecto del envejecimiento

Para identificar los genes y los procesos biológicos afectados por el envejecimiento (una diferencia de edad de 88 meses), se compararon las muestras de tejido de ajolotes adultos con las muestras provenientes de ajolotes subadultos. Aunque el número total de DEGs en este contraste fue menor que el del contraste entre blastema y extremidades, de manera similar reveló más genes regulados a la baja que al alza: 38-50 subexpresados y 4-8 sobreexpresados (**Figura 6.3**). Por el contrario, la mayoría de los términos GO enriquecidos experimentaron una activación en lugar de una supresión. Sin embargo, en el caso de las vías KEGG, 7 términos fueron detectados como suprimidos y solo 2 como activados. En términos generales, los términos suprimidos están relacionados con los constituyentes de la matriz extracelular, la coagulación, el lumen de Golgi y la vía de señalización estimulante del receptor de lectina de tipo C. Al igual que en el contraste de blastema contra el tejido de la extremidad, los términos activados en el contraste de edades incluyeron vías como el ensamblaje de elementos ribosomales, la traducción, el catabolismo de mRNA y el direccionamiento de proteínas (**Figura 6.4**). Esto sugiere que, en ajolotes nativos, la producción y metabolismo del mRNA y

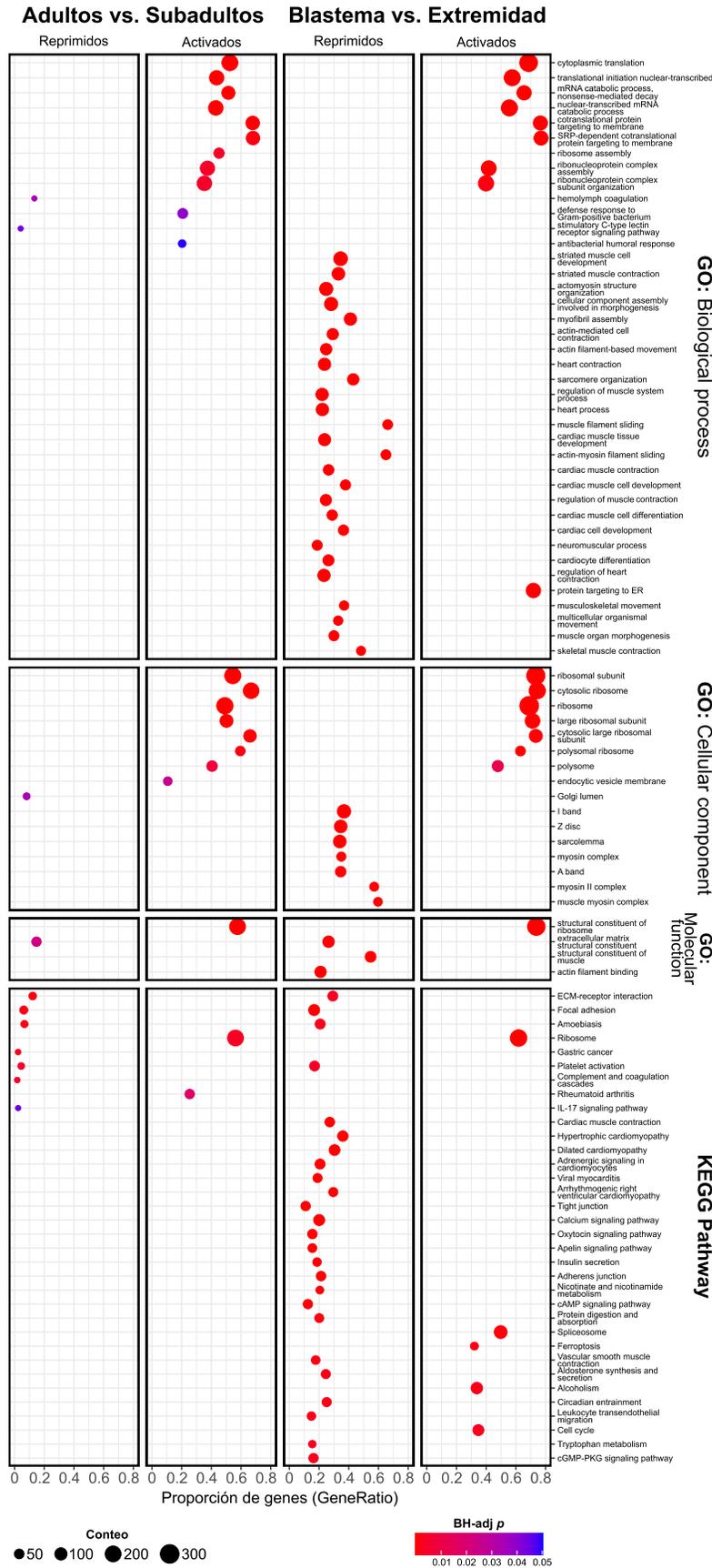


Figura 6.4. Enriquecimiento de vías biológicas durante la regeneración y el envejecimiento en ajolotes nativos. Gráfico de puntos muestra los términos de Gene Ontology (GO) y las vías de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) detectados como significativamente activados o reprimidos en cada contraste mediante un análisis rápido de enriquecimiento de conjuntos de genes (FGSEA).

las proteínas son procesos afectados por el aumento en la edad, pero también requeridos para la formación del blastema. Por otro lado, la supresión de las vías del desarrollo muscular parece ser característica del proceso regenerativo, ya que no se observó en el contraste de adultos y subadultos nativos.

6.1.3. La expresión diferencial de retrotransposones durante la regeneración

Con el objetivo de observar el papel de los elementos repetitivos, se cuantificó y analizó su expresión a nivel de subfamilia. Las «inserciones» o loci de elementos repetitivos dentro de un genoma particular se pueden agrupar en subfamilias, que son conjuntos de REs que están altamente relacionados a nivel de similitud de secuencia y son relativamente distintos de otros elementos (Jurka *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2015). En la comparación del blastema contra el tejido de la extremidad, el análisis reveló únicamente 7-8 subfamilias de REs expresadas diferencialmente (DEREs), en específico, 2-6 subfamilias reguladas negativamente y 1-6 reguladas positivamente (**Figura 6.5a**). A pesar del reducido número de subfamilias con expresión significativamente distinta, se detectó un patrón aparente de regulación negativa de elementos repetitivos. Además, considerando que cada una de estas DEREs puede abarcar múltiples loci, desde ~200 hasta más de ~11 000 inserciones (Nowoshilow *et al.*, 2018), el efecto de su subexpresión en el blastema puede tener un impacto genómico o regulatorio incluso más importante que el de los DEGs detectados en el análisis anterior. Entre las DEREs identificadas, 6 pertenecen a la familia Chromoviridae y 6 a la familia Mag, ambas miembros de la superfamilia de retrotransposones Ty3 y la clase LTR, las más abundantes en el genoma del ajolote. Un hallazgo relevante fue que tres DEREs no han sido anotadas en la biblioteca de repetidos de referencia para *A. mexicanum* y están etiquetadas como pertenecientes a una clase desconocida. En el contraste entre grupos de edad, solo un método de cuantificación, ExplorATE, permitió la detección de un reducido número de DEREs (**Figura 6.5b**).

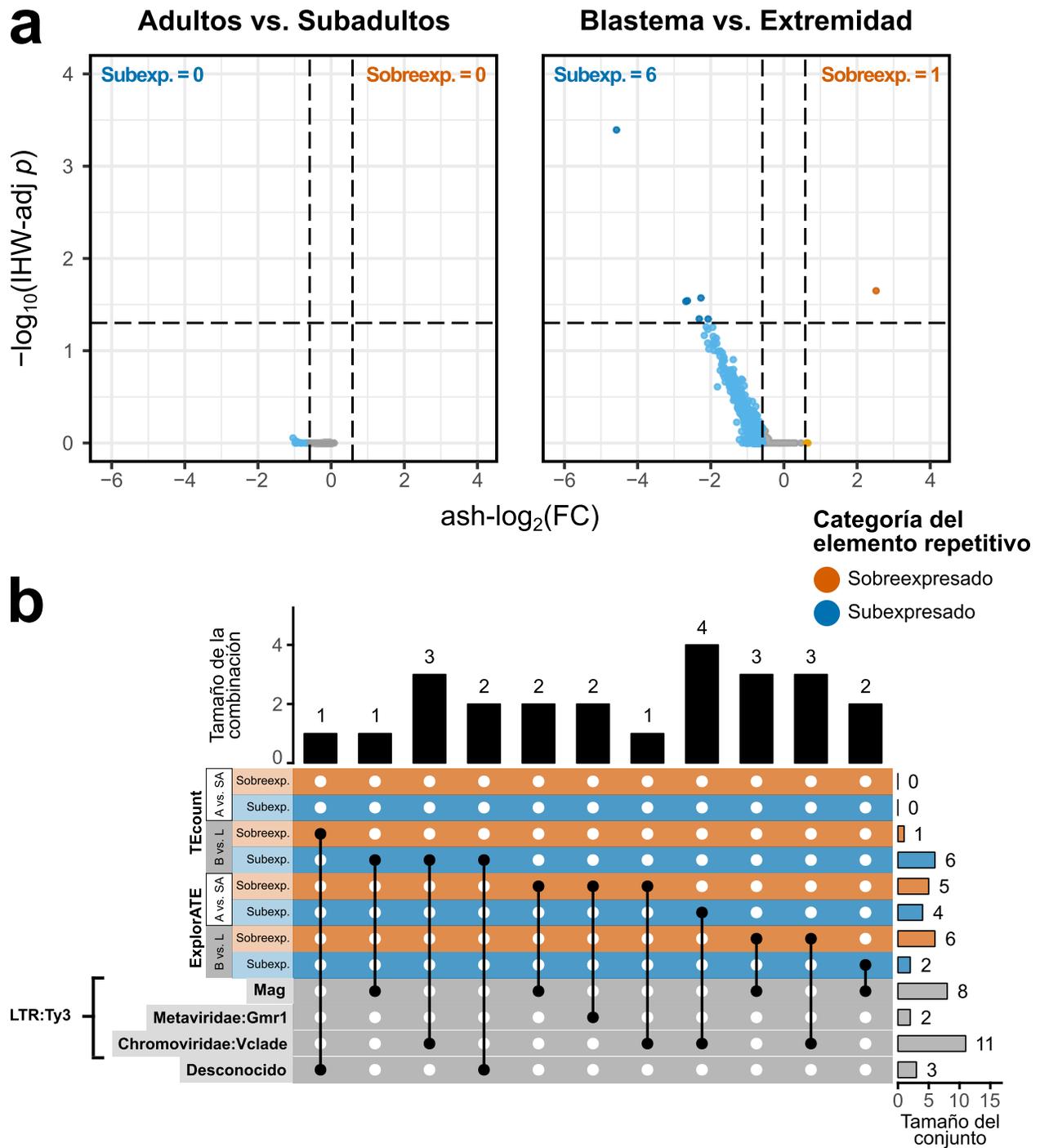


Figura 6.5. Expresión diferencial de elementos repetitivos (REs) durante la regeneración y el envejecimiento en ajolotes nativos. (a) Los gráficos de volcán muestran las subfamilias REs diferencialmente expresadas (DEREs) entre muestras de adultos y subadultos y entre muestras de blastema y extremidad. Los REs significativamente sobreexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) > \log_2(1.5)$, $\text{IHW-adj } p < 0.05$) o subexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) < -\log_2(1.5)$, $\text{IHW-adj } p < 0.05$) están representados por puntos de color naranja oscuro y azul oscuro, respectivamente. (b) gráfico *UpSet* del total de DEREs por contraste y método de cuantificación, sus distintas combinaciones y su estado de anotación.

Para comparar conjuntamente la expresión de genes y RE, se realizó una agrupación jerárquica de los genes y elementos repetitivos con el *log fold change* (LFC) absoluto más alto tanto para los contrastes de tejido como de grupo de edad. Con este fin, se calculó la cantidad en la que cada gen/RE en una muestra específica se desviaba de su promedio de expresión en todas las muestras (desviación con respecto a la media) y luego se agruparon los genes y RE seleccionados en tres clústeres mediante división del dendrograma global (**Figura 6.6**).

Con este método, se detectaron dos bloques principales de genes/RE que covarían entre tipos de tejido (blastema versus extremidad), uno incluye genes regulados negativamente relacionados con el desarrollo y función musculares (clúster 1: *MYL2*, *MYH3*, *CASQ1*, *TNNT3*, etc.). El otro bloque conecta a un RE desconocido (*rnd-6_family-8458*) con genes sobreexpresados relacionados con la formación, remodelación y regeneración ósea (clúster 3: *KAZALD1*, *ODAM*, *IL11*, *ANGPTL2*, etc.). En lo que respecta al contraste de edades, se identificó otro conjunto de genes para los cuales los ajolotes adultos tienen una expresión más baja (clúster 3: *LY6E*, *HBZ*, *COL1A1/2*, *LOC115082697*, etc.) y una expresión más alta (clúster 2: *ORF2*, *NNMT* y *ZNF665*) que los ajolotes subadultos. Adicionalmente, se detectó un conjunto de genes/RE que covarían tanto entre tejidos como entre grupos de edad: una quinasa específica de proteínas ricas en serina/arginina (*SRPK3*), una serina proteasa inactiva (*PRSS35*), la osteocalcina (*BGLAP*), una esfingomielina fosfodiesterasa (*SMPD3*) y una endoribonucleasa del extremo 3' de pre-mRNAs codificantes de histonas (*MBLAC1*). Estos genes, junto con cuatro retrotransposones Ty3 y dos REs desconocidos, también son regulados negativamente en el blastema en comparación con el tejido de la extremidad.

Los elementos repetitivos han mostrado un potencial regulador considerable, específicamente en la modificación de la expresión génica (Slotkin y Martienssen, 2007; López-Maury *et al.*, 2008; Cowley y Oakey, 2013; Liu *et al.*, 2022). Para abordar el posible papel regulador de las DEREs identificadas en el desarrollo del blastema, se evaluó su contexto genómico y su vecindad con los genes detectados como diferencialmente expresados. Para esto, se anotó cada locus de cada DERE con respecto a su característica genómica o génica más cercana. Como se muestra en la **Cuadro 6.1**, la mayoría de los loci de DEREs se ubicaron en regiones intergénicas y en los intrones de genes que

6. Resultados

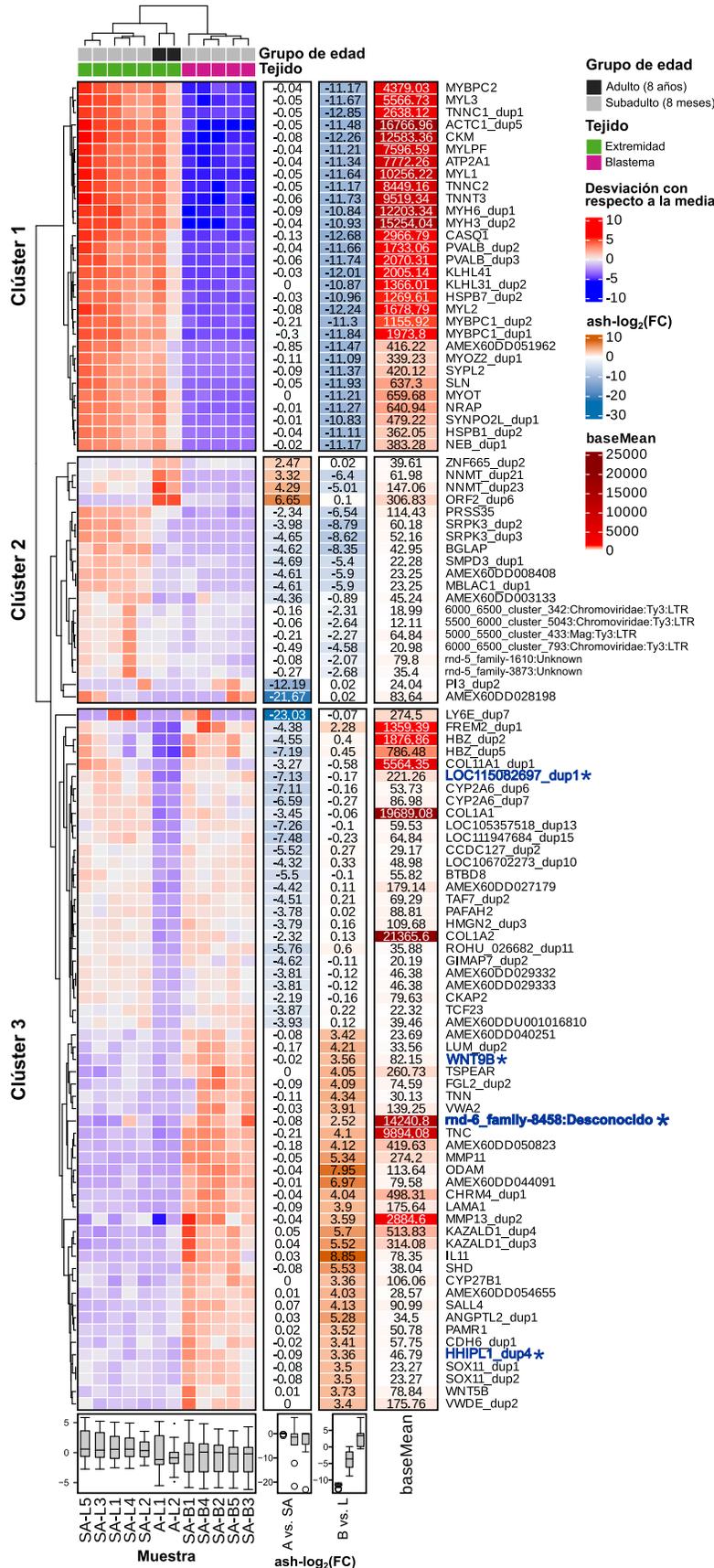


Figura 6.6. Agrupamiento de genes y elementos repetitivos (REs) con base en su desviación con respecto a la media y expresión diferencial en muestras de ajolotes nativos. Mapa de calor de la desviación de cada gen o RE con respecto a su media (con base en conteos normalizados con VST), dividido en grupos por el dendrograma global. Las columnas con el ash-log₂(FC) por contraste y baseMean se muestran a la derecha para cada gen/RE. Los genes etiquetados en azul y con un asterisco (*) tienen una superposición genómica o proximidad relativa a un locus del RE, también marcado en azul con un asterisco.

Cuadro 6.1. Resumen de los loci de subfamilias de elementos repetitivos expresados diferencialmente y las características genómicas (regiones intragénicas o intergénicas) con las que se superponen para el contraste entre tejidos de blastema y extremidad en ajolotes nativos.

Elemento genómico/génico	Categoría del gen	Clúster compartido en mapa de calor (Figura 6.6)	REs subexpresadas						RE sobreexpresada
			5000_5500_eluster_433	5500_6000_eluster_5043	6000_6500_eluster_342	6000_6500_eluster_793	md-5_family-1610	md-5_family-3873	md-6_family-8458
TSS-promotor	no DEG	No compartido	5	.	.	.	3	1	7
	subexpresado	No compartido
	sobreexpresado	No compartido
TTS	no DEG	No compartido	1	5	11
	subexpresado	No compartido	1	.	.
	sobreexpresado	No compartido
CDS	no DEG	No compartido	1	.	4
	subexpresado	No compartido
	sobreexpresado	No compartido
5'-UTR	no DEG	No compartido	2	.	.	.	1	.	4
	subexpresado	No compartido
	sobreexpresado	No compartido
3'-UTR	no DEG	No compartido	4	.	1	.	1	.	3
	subexpresado	No compartido	1
	sobreexpresado	No compartido
exónico	no DEG	No compartido	3	.	.	.	3	1	18
	subexpresado	No compartido
	sobreexpresado	No compartido
intrónico	no DEG	No compartido	431	79	75	90	500	1761	1749
		Compartido	2
	subexpresado	No compartido	20	5	1	5	10	110	76
	sobreexpresado	No compartido	4	.	1	1	4	12	5
		Compartido	1
otro génico	no DEG	No compartido	1	1

RE: subfamilia de elementos repetitivos, DERE: RE expresada diferencialmente, DEG: gen no expresado diferencialmente.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro 6.1 – continúa desde la página anterior

Elemento genómico/génico	Categoría del gen	Clúster compartido en mapa de calor (Figura 6.6)	REs subexpresadas					RE sobreexpresada	
			5000_5500_cluster_433	5500_6000_cluster_5043	6000_6500_cluster_342	6000_6500_cluster_793	rnd-5_family-1610	rnd-5_family-3873	rnd-6_family-8458
-5 kb	subexpresado	No compartido
	sobreexpresado	No compartido
	no DEG	No compartido	10	3	2	1	11	39	45
+5 kb	subexpresado	No compartido	1	.	.
	sobreexpresado	No compartido	1
	no DEG	No compartido	18	2	2	1	7	36	30
-10 kb	subexpresado	No compartido	2	1
	sobreexpresado	No compartido	1
	no DEG	No compartido	15	3	2	4	17	61	44
+10 kb	subexpresado	No compartido	1	1	3
	sobreexpresado	No compartido	1
	no DEG	No compartido	29	3	3	2	16	68	38
-50 kb	subexpresado	No compartido
	sobreexpresado	No compartido
	no DEG	Compartido	1
+50 kb	subexpresado	No compartido	97	20	18	18	179	598	306
	sobreexpresado	No compartido	2	.	.	.	1	10	7
	no DEG	No compartido	1	5	.
región intergénica	subexpresado	No compartido	90	23	13	17	164	438	223
	sobreexpresado	No compartido	3	.	.	.	3	11	4
	no DEG	No compartido	4	.	.
Loci totales por DERE			1636	340	240	303	3167	11205	5724

RE: subfamilia de elementos repetitivos, DERE: RE expresada diferencialmente, no DEG: gen no expresado diferencialmente.

no presentaron una expresión diferencial significativa (no DEG). De hecho, solo una DERE de clase desconocida (*rnd-6_family-8458*) contuvo loci que además de colocalizar o tener una superposición genómica con un DEG, compartieron un grupo de desviación de la media con ese mismo DEG. Entre los DEGs que colocalizaron con *rnd-6_family-8458* se encuentran *WNT9B*, *HHIPL1* y *LOC115082697*. Específicamente, solo 2 de 5724 loci de *rnd-6_family-8458* están contenidos en el intrón más posterior de *LOC115082697*, un gen que está subexpresado en ajolotes adultos (**Figura 6.7 y Cuadro 6.1**).

Para asignarle una posible función, se buscó la secuencia consenso traducida de *rnd-6_family-8458* frente a las bases de datos de dominios proteicos InterPro, PFAM y RepeatPeps (Repeatmasker), sin embargo, estas solo revelaron una coincidencia: una región de una proteína que se predice que se incrusta en la membrana (TMhelix). En general, estos resultados sugieren que la potencial regulación de la expresión génica por parte de los elementos repetitivos es independiente de su proximidad genómica a los genes. En otras palabras, como los DEREs se detectaron fuera y lejos de los DEGs, es probable que su efecto modulador no sea directo y requiera de la generación de intermediarios o la interacción con otros factores reguladores.

6.2. Análisis global de muestras de RNA-seq de ajolote

6.2.1. La expresión diferencial de genes en el envejecimiento y la regeneración

Para determinar si la expresión de genes con funciones en la regeneración se ve afectada de manera diferente por la edad en distintos tipos de tejido, como el efecto en el blastema comparado con el efecto sobre la extremidad, se integraron 124 muestras de RNA-seq publicadas previamente que comprendían tejidos distintos a la extremidad (no extremidad), tejidos de la extremidad y blastemas de la extremidad, categorizados en grupos de edad: subadultos y adultos. Luego se cuantificaron y contrastaron sus niveles de expresión de genes y REs junto con las muestras nativas de este trabajo (**Cuadro B.1**). Con base en el PCA de las 136 muestras (**Figura 6.8**), los análisis de expresión posteriores se realizaron considerando los efectos del lote.

6. Resultados

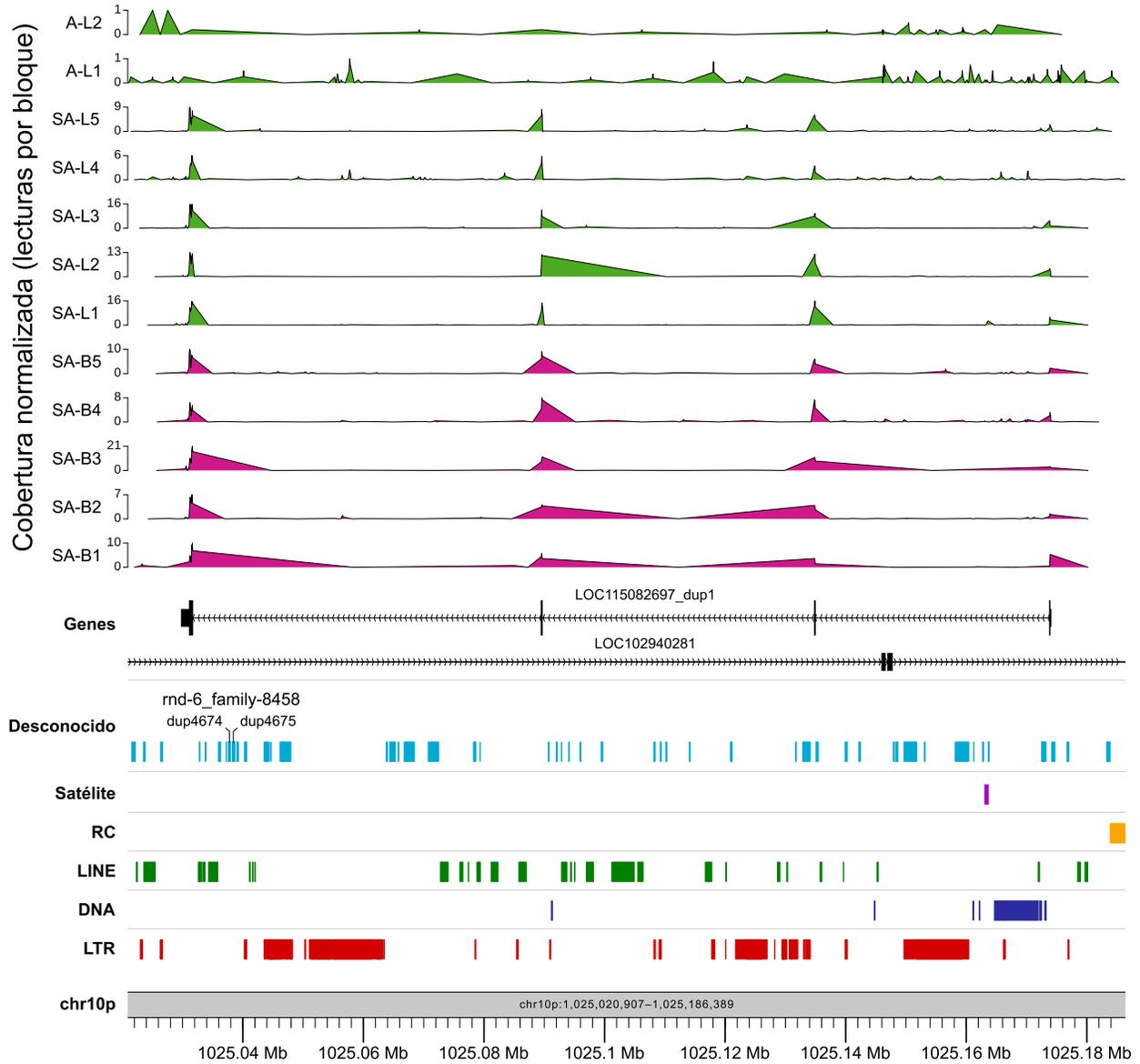


Figura 6.7. Contexto genómico del gen *LOC115082697* y el elemento repetitivo *rnd-6_family-8458*, ambos sobreexpresados en el blastema. *Karyoplot* de *LOC115082697_dup1*, uno de los tres genes expresados diferencialmente en el blastema que presentan un solapamiento genómico con un locus de un elemento repetitivo diferencialmente expresado (*rnd-6_family-8458*) en el mismo clúster del mapa de calor. La cobertura de lecturas de RNA-seq de cada muestra se muestra en la parte superior. SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad.

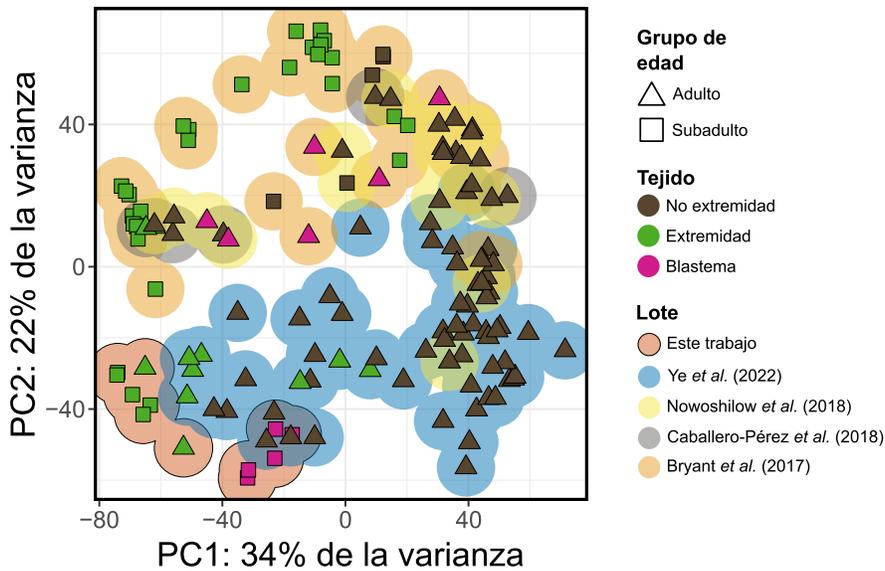


Figura 6.8. Gráfico de análisis de componentes principales (PCA) de los recuentos de genes y elementos repetitivos del análisis de muestras global. Se muestran los conteos de las 136 muestras de RNA-seq analizadas, incluyendo los tejidos de ajolotes nativos y las muestras publicadas previamente. Los conteos fueron normalizados con transformación estabilizadora de la varianza (VST).

En resumen, se encontró que los ajolotes más viejos exhiben muchos genes subexpresados y sobreexpresados en comparación con sus contrapartes más jóvenes en todos los tejidos evaluados (**Figura 6.9**). Se identificaron 3943-4281 genes regulados positivamente y 1190-1276 regulados negativamente en el contraste de los tejidos que no son de las extremidades, 4763-4887 genes regulados positivamente y 2490-2661 regulados negativamente en la comparación de las extremidades, y 623-748 genes regulados positivamente y 331-421 regulados negativamente en el contraste de blastemas. Además, 2622 (~54 %) de los 4887 genes que se detectaron como sobreexpresados en la comparación entre las extremidades de adultos y subadultos también estaban subexpresados en el blastema adulto, lo que representa un ~63 % del total de 4176 genes que estuvieron regulados negativamente en blastemas adultos en comparación con las extremidades adultas (**Figuras 6.9 y 6.11**). Sin embargo, en términos tanto de cantidad como de tipo de vías biológicas enriquecidas, los tejidos correspondientes a no extremidad y a extremidad de ajolotes adultos fueron mucho más similares entre sí que con los blastemas adultos. En los tejidos de extremidad y no extremidad el envejecimiento desencadena una supresión sustancial de vías relacionadas con la traducción,

6. Resultados

el desarrollo muscular y la activación de la motilidad celular y la formación de cilios o flagelos; mientras que en el blastema la edad solo provoca una activación limitada de las vías relacionadas con el desarrollo de las células del cristalino y los metabolismos de nicotinato, nicotinamida, piridina y selenocompuestos (**Figura 6.10**).

En concordancia con lo se observó en los contrastes de edad, las comparaciones por tipo de tejido revelaron que, durante la regeneración, el blastema exhibe una regulación negativa importante y una (menor) regulación positiva de genes en comparación con los tejidos de las extremidades y de no extremidad (**Figura 6.11**). A nivel de vías biológicas, los blastemas de los ajolotes adultos mostraron una activación significativa de los ribosomas citosólicos, la morfogénesis embrionaria de las extremidades y el sistema esquelético, y el desarrollo no embrionario de cartílagos y extremidades,

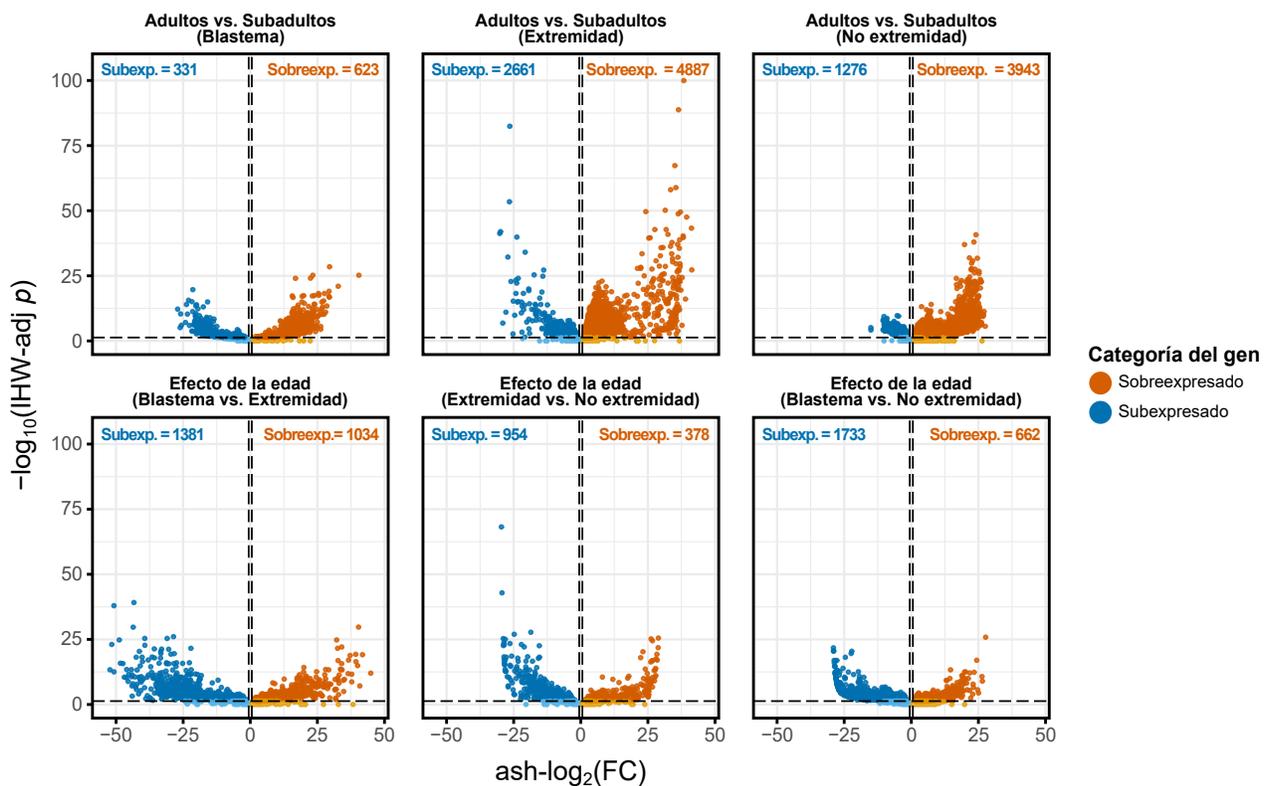


Figura 6.9. Diferencias en la expresión génica entre muestras globales de distintos tejidos y grupos de edad en ajolotes. Los gráficos de volcán muestran las diferencias en la expresión génica entre adultos y subadultos para cada tipo de tejido y las diferencias en el efecto de la edad para cada comparación de tejidos. Los genes significativamente sobreexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) > \log_2(1.5)$, IHW-adj $p < 0.05$) o subexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) < -\log_2(1.5)$, IHW-adj $p < 0.05$) están representados por puntos de color naranja oscuro y azul oscuro, respectivamente.

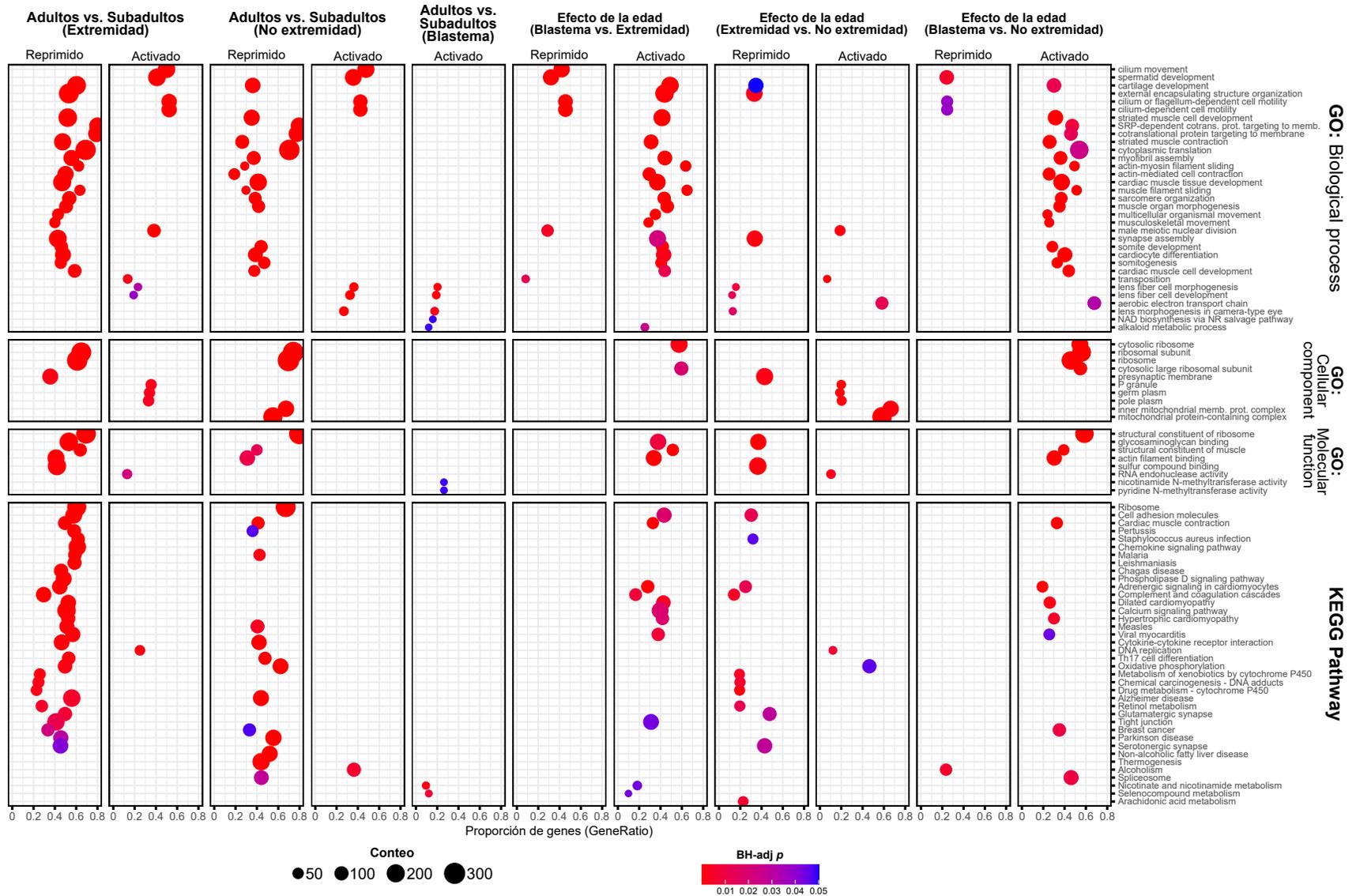


Figura 6.10. Enriquecimiento de vías biológicas durante el envejecimiento en ajolotes. El diagrama de puntos muestra los términos de ontología génica (GO) y las vías de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) significativamente activados o suprimidos en cada contraste mediante un análisis rápido de enriquecimiento de conjuntos de genes (FGSEA).

6. Resultados

en contraste con la extremidad (**Figura 6.12**). Al mismo tiempo, exhibieron supresión de la transposición, la motilidad celular dependiente de cilios o flagelos y el desarrollo de espermátidas. La subexpresión y sobreexpresión de genes entre el blastema y los otros tejidos fueron más fuertes en las muestras de ajolotes adultos que en las muestras de ajolotes subadultos (**Figura 6.11**). Sin embargo, los blastemas de ajolotes subadultos no mostraron una activación significativa de vías biológicas en comparación con los tejidos de las extremidades, sino solo una pequeña supresión de los componentes celulares involucrados en la morfogénesis y las vías de desarrollo y contracción musculares, como el ensamblaje de miofibrillas y la organización de los sarcómeros (**Figura 6.12**).

En resumen, se descubrió una diferencia significativa en el efecto que tiene la edad sobre el blastema, respecto al efecto que tiene sobre la extremidad. En relación con la extremidad, el enve-

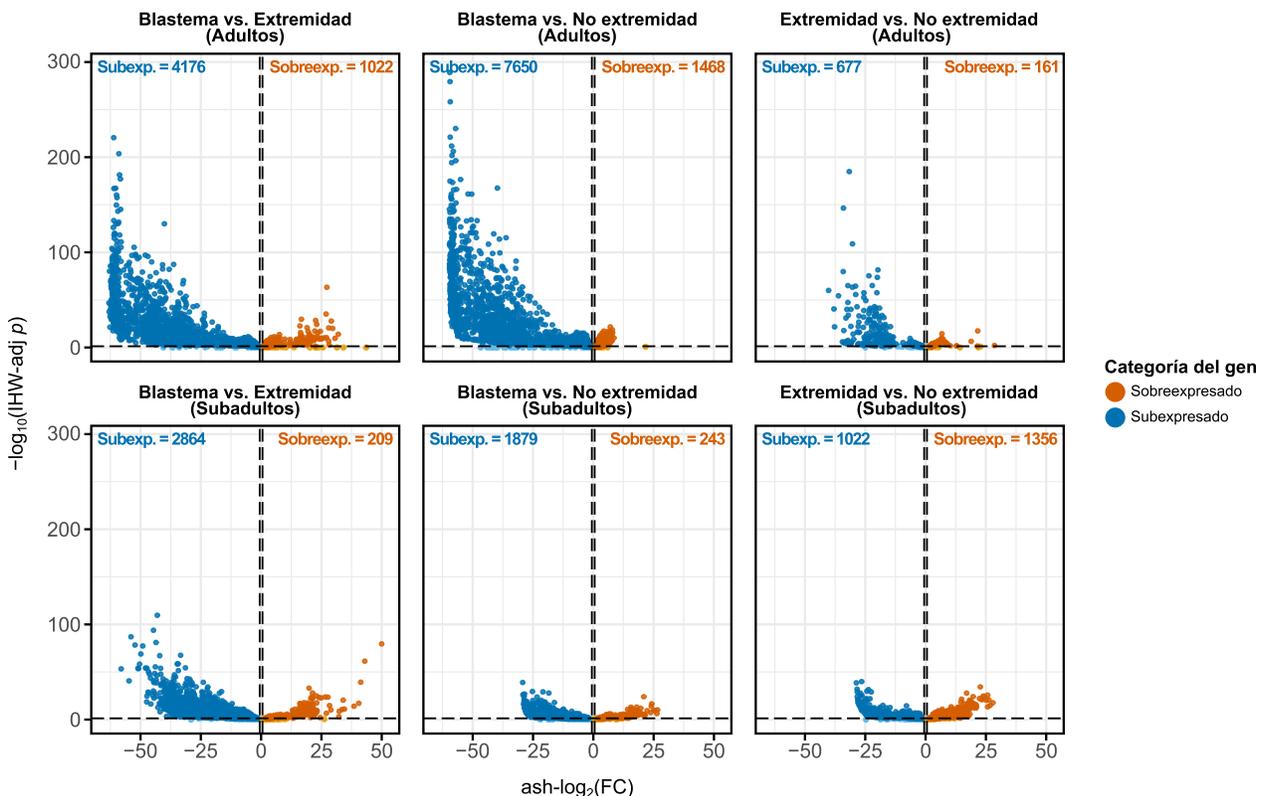


Figura 6.11. Diferencias en la expresión génica entre muestras globales de distintos tejidos de ajolote. Los gráficos de volcán muestran las diferencias de expresión génica entre tejidos, por separado para cada grupo de edad (adultos y subadultos). Los genes significativamente sobreexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) > \log_2(1.5)$, $\text{IHW-adj } p < 0.05$) o subexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) < -\log_2(1.5)$, $\text{IHW-adj } p < 0.05$) están representados por puntos de color naranja oscuro y azul oscuro, respectivamente.

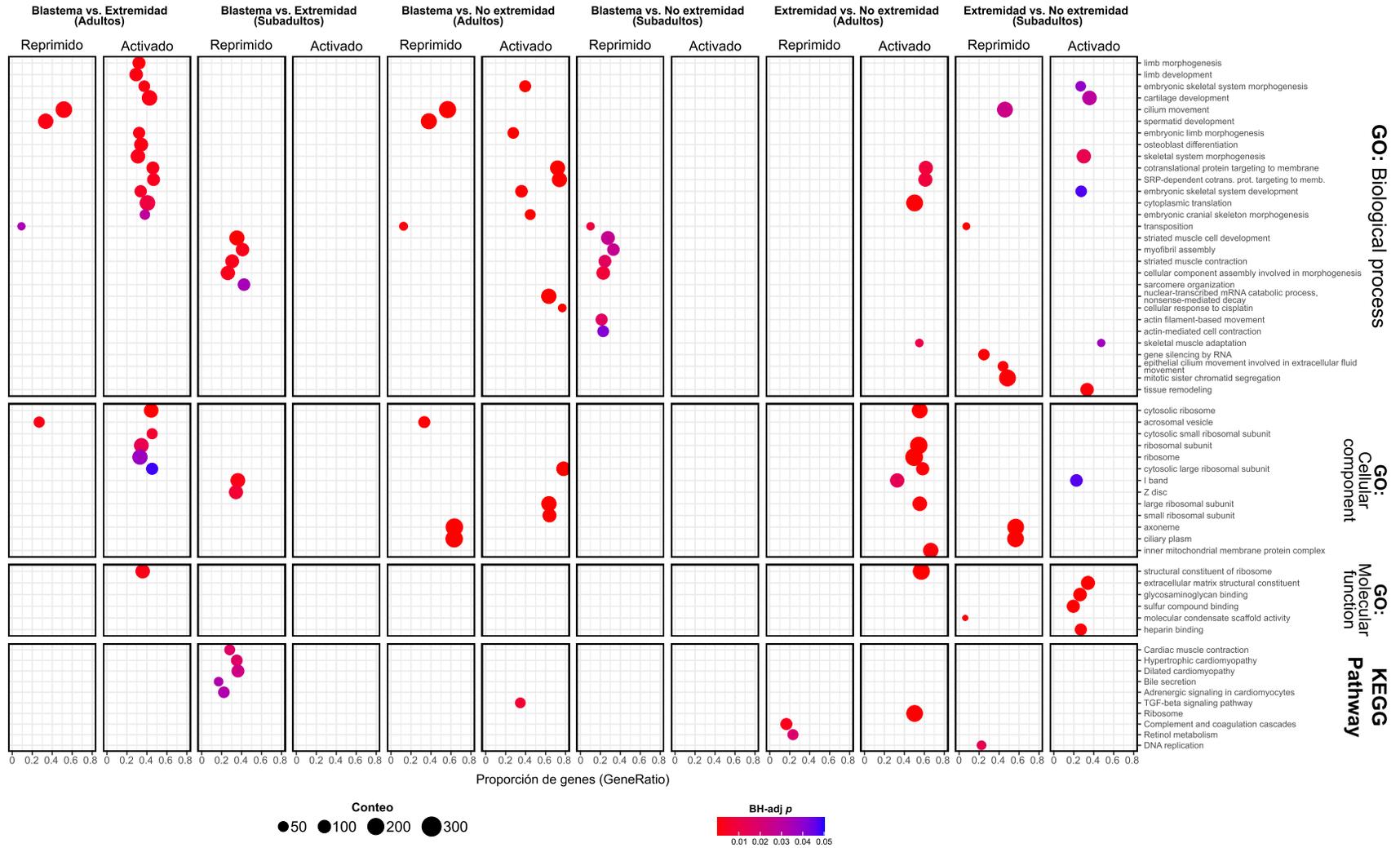


Figura 6.12. Enriquecimiento de vías biológicas durante la regeneración de la extremidad en ajolotes. El diagrama de puntos muestra los términos de ontología génica (GO) y las vías de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) significativamente activados o suprimidos en cada contraste mediante un análisis rápido de enriquecimiento de conjuntos de genes (FGSEA).

jecimiento tiene un efecto positivo neto sobre el músculo estriado, el cartílago y el desarrollo de sinapsis en el blastema (**Figura 6.10**). En otras palabras, la supresión del desarrollo de la estructura muscular y nerviosa relacionada con la edad que se observa en las extremidades de edad avanzada parece alcanzar un efecto casi equivalente, fuera del proceso regenerativo, a la supresión muscular necesaria durante el desarrollo del blastema. Por el contrario, dado que las extremidades de los ajolotes subadultos no han sufrido un efecto relacionado con la edad, sus blastemas sí inducen una represión del desarrollo del músculo estriado (**Figura 6.12**). Esto sugiere que el envejecimiento limita específicamente la modulación de la formación de tejidos musculares durante la regeneración, lo que podría ser una de las principales razones por las que la regeneración de la extremidad se vuelve menos eficiente con la edad.

6.2.2. La expresión diferencial de elementos repetitivos en el envejecimiento y la regeneración

Posteriormente, se evaluó la expresión de REs a nivel de subfamilia en todas las muestras. Se halló que los ajolotes más viejos exhiben una mayor expresión de retrotransposones que sus homólogos más jóvenes en las extremidades y otros tejidos, pero no en el tejido regenerativo de la extremidad. En la comparación de tejidos de no extremidad entre adultos y subadultos, se identificaron 3-31 DEREs reguladas negativamente y 134-396 reguladas positivamente, siendo la mayoría retrotransposones Ty3 (LTR) o REs desconocidos (**Figura 6.13 y Cuadro 6.2**). De manera similar, el contraste de las extremidades entre diferentes grupos de edad mostró 0-24 DERE subexpresadas y 223-519 sobreexpresadas, de las cuales la mayoría eran Ty3 o REs desconocidos. Por el contrario, no se detectó ningún RE expresado diferencialmente de manera significativa en la comparación entre blastemas de adultos y blastemas de subadultos.

De acuerdo con lo que se observó en las comparaciones entre grupos de edad, los contrastes por tipo de tejido revelaron que, durante la regeneración de la extremidad, el blastema muestra una subexpresión importante de, principalmente, retrotransposones Ty3 de las familias Chromoviridae y Mag, versus las muestras de tejidos de la extremidad y de no extremidad (**Figura 6.14**). Esta

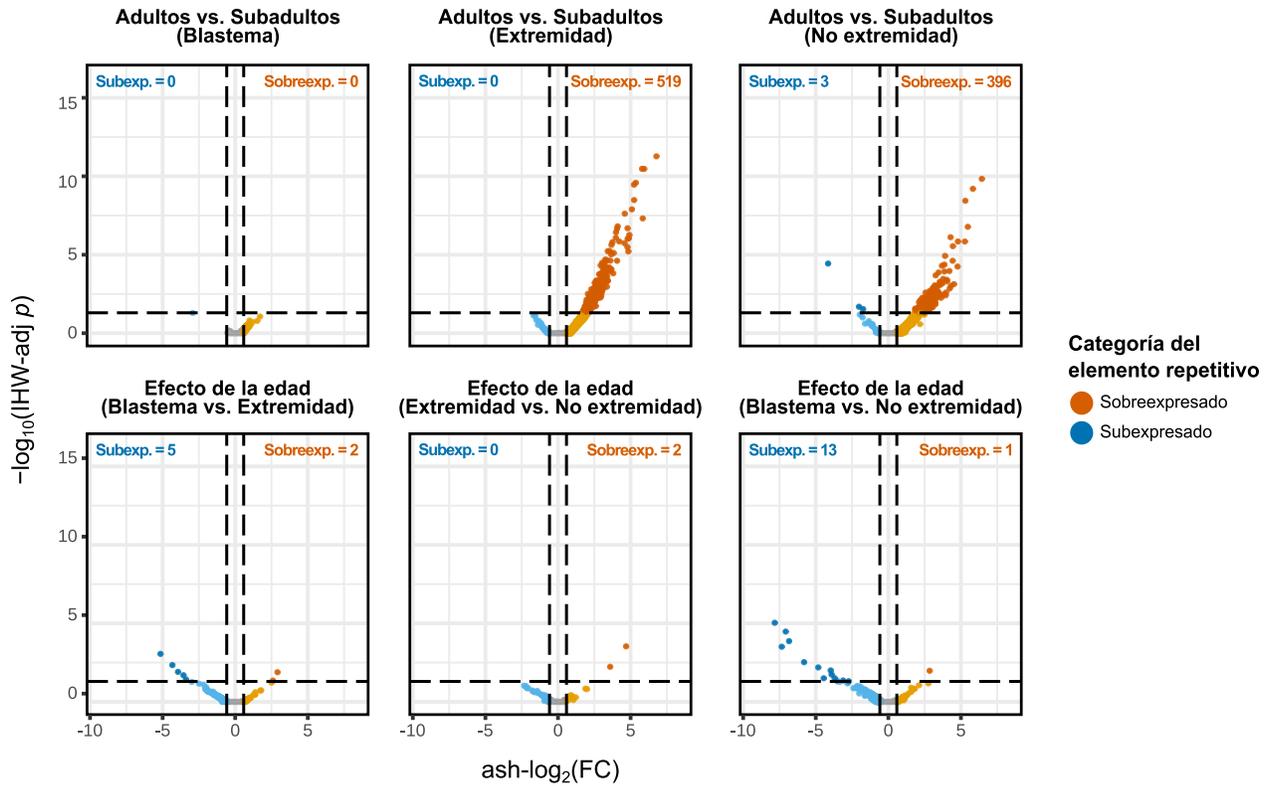


Figura 6.13. Diferencias en la expresión de elementos repetitivos (REs) entre muestras globales de distintos tejidos y grupos de edad en ajolotes. Los gráficos de volcán muestran las diferencias en la expresión de REs entre adultos y subadultos para cada tipo de tejido y las diferencias en el efecto de la edad para cada comparación de tejidos. Los REs significativamente sobreexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) > \log_2(1.5)$, $\text{IHW-adj } p < 0.05$) o subexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) < -\log_2(1.5)$, $\text{IHW-adj } p < 0.05$) están representados por puntos de color naranja oscuro y azul oscuro, respectivamente.

regulación negativa de la expresión de REs entre el blastema y las extremidades o tejidos de no extremidad aparentó ser más intensa en las muestras de ajolotes adultos que en las muestras de ajolotes subadultos. Además, 209 (~40 %) de los 519 REs que se detectaron como regulados positivamente en la comparación entre las extremidades de adultos y subadultos también estuvieron regulados negativamente en el blastema adulto, lo que representa un ~72 % del total de 304 REs que se identificaron como subexpresados en los blastemas adultos al contrastarlos con las extremidades adultas (**Figuras 6.13 y 6.14**). Sin embargo, contrariamente a lo que se encontró para los genes codificantes de proteínas, la diferencia en el efecto de la edad sobre el blastema, en comparación con el efecto que tiene sobre la extremidad, es significativa solo para unas pocas subfamilias, incluidos dos LTRs Epsilon regulados al alza y un LTR Spuma y cuatro REs desconocidos regulados a la baja

(Figura 6.13). Estos resultados indican que el blastema adulto es capaz de suprimir la mayor parte de la sobreexpresión de REs causada por el envejecimiento en la extremidad, aunque la desregulación de los genes codificantes se matenga afectada.

Para analizar la expresión de genes y RE de manera conjunta, se llevaron a cabo agrupaciones jerárquicas con base en la desviación con respecto a la media de cada elemento y luego se dividieron los genes y REs seleccionados en cuatro grupos mediante el dendrograma global.

En los clústeres 2 y 4 del primer dendrograma (Figura 6.15) se detectó un conjunto de genes/REs que covarían y son afectados por el envejecimiento en la extremidad, lo cual permitió asociar varios genes (*ZNF569*, *DMRTB1*, *TESMIN*, *RTL1*, *ADAM9*, *ARHGAP11A*, *PGBD4*, *H2BC1*, *FERD3L*, etc.) y LTRs (Chromoviridae, Mag, Metaviridae, Epsilon, Spuma, ERVL) regulados po-

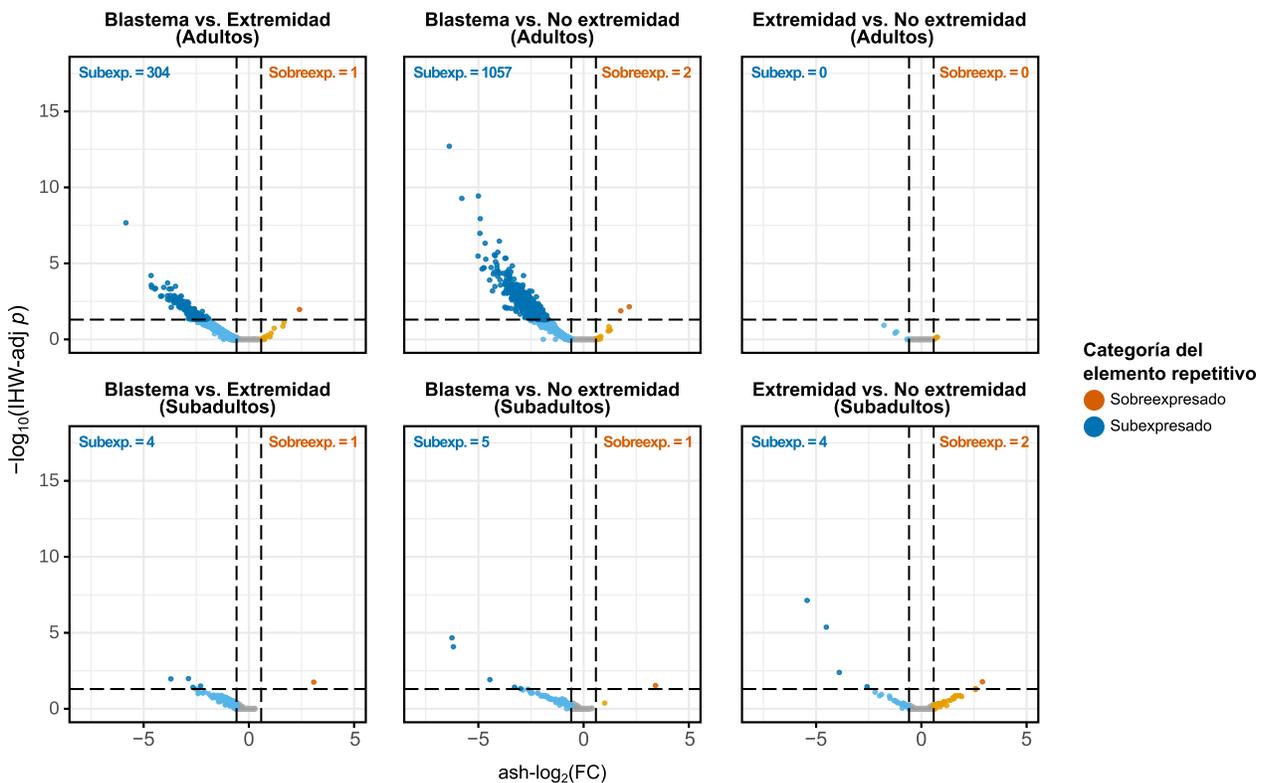


Figura 6.14. Diferencias en la expresión de elementos repetitivos (REs) entre muestras globales de distintos tejidos de ajolote. Los gráficos de volcán muestran las diferencias de expresión de REs entre tejidos, por separado para cada grupo de edad (adultos y subadultos). Los elementos repetitivos significativamente sobreexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) > \log_2(1.5)$, IHW-adj $p < 0.05$) o subexpresados ($\text{ash-log}_2(\text{FC}) < -\log_2(1.5)$, IHW-adj $p < 0.05$) están representados por puntos de color naranja oscuro y azul oscuro, respectivamente.

Cuadro 6.2. Recuento y anotación de las subfamilias de elementos repetitivos expresadas diferencialmente en los contrastes de edad y tejido de muestras de ajolote.

Grupo de muestras	Muestras contrastadas (efectos estimados)	Categoría de expresión diferencial	LTR									LINE				SINE	DNA					RC			TOTAL			
			Ty3	ERV1	ERV2	Epsilon	Foamy	Bel-Pao	Copia	DIRS	Sputnik	L1	Penelope	Tad1	RTE-X	L2	5S-Deu-L2	PIF-Harbinger	hAT-Ac	hAT-Blackjack	hAT-Charlie	hAT-Tip100	DNA	Helitron		Satélite	Desconocido	
Este trabajo (nativos)	Adultos vs. Subadultos	sobreexpresado	5	5
		subexpresado	4
	Blastema vs. Extremidad	sobreexpresado	6	1	7	
		subexpresado	6	2	8	
Análisis global	Adultos vs. Subadultos (Blastema)	sobreexpresado	23	.	.	4	2	29	
		subexpresado	17	.	1	1	1	20	
	Adultos vs. Subadultos (Extremidad)	sobreexpresado	549	1	.	8	1	1	.	.	15	.	1	.	.	1	2	1	.	1	.	.	3	.	48	632		
		subexpresado	7	1	2	2	.	1	.	.	7	.	.	.	3	1	24	
	Adultos vs. Subadultos (No extremidad)	sobreexpresado	405	1	.	5	1	1	.	.	6	1	.	.	1	2	.	.	1	.	.	3	.	44	471			
		subexpresado	15	1	3	5	5	.	.	1	1	31	
	Efecto de la edad (Blastema vs. Extremidad)	sobreexpresado	6	.	.	6	12	
		subexpresado	32	.	.	1	1	4	38	
	Efecto de la edad (Blastema vs. No extremidad)	sobreexpresado	18	.	.	9	.	.	.	3	.	.	.	1	31	
		subexpresado	44	.	.	1	.	.	.	1	1	1	8	56	
	Efecto de la edad (Extremidad vs. No extremidad)	sobreexpresado	23	1	.	1	.	.	.	3	28	
		subexpresado	6	1	7	
	Blastema vs. Extremidad (Adultos)	sobreexpresado	6	1	.	5	12	
		subexpresado	301	1	.	3	4	.	.	1	.	.	3	.	.	1	.	.	2	.	31	347		
	Blastema vs. Extremidad (Subadultos)	sobreexpresado	18	.	1	1	.	.	.	3	1	24	
		subexpresado	10	.	.	3	.	1	.	3	1	18	
	Blastema vs. No extremidad (Adultos)	sobreexpresado	17	1	.	6	.	.	.	1	25	
		subexpresado	906	4	1	11	1	6	1	6	14	6	1	1	1	1	6	2	.	1	.	.	5	2	116	1092		
	Blastema vs. No extremidad (Subadultos)	sobreexpresado	17	.	1	1	1	20		
		subexpresado	24	1	.	3	.	.	.	3	31	
	Extremidad vs. No extremidad (Adultos)	sobreexpresado	0	
		subexpresado	0	
	Extremidad vs. No extremidad (Subadultos)	sobreexpresado	16	6	.	.	.	1	.	.	1	24	
		subexpresado	36	1	.	4	.	.	.	4	1	46	

sitivamente con varios genes regulados negativamente (*NOX1*, *MDY*, *UGT1A1*, *BTBD17*, *BIRC5*, *GIMAP4*, *AK8*, *MSGNI*, *SLC6A3*, *TXNC2*, etc.). Esta similitud entre genes y REs, tanto en los patrones de variación con respecto a la media como en la expresión diferencial absoluta, sugiere que estos genes y REs podrían estar regulados por los mismos factores. Además, es importante recalcar que se identificaron muchos genes no anotados y REs desconocidos con un perfil de variación similar asociado con la extremidad envejecida. Este hallazgo resalta la importancia de estudiar las regiones no anotadas del genoma del ajolote, ya que muestran patrones de expresión claramente diferenciados, similares a los de genes o elementos repetitivos conocidos, lo que sugiere que podrían tener una función regulatoria necesaria en el desarrollo de la extremidad. De manera opuesta, para la mayoría de los genes/REs de este conjunto, el envejecimiento tiene un efecto significativamente diferente en el blastema. Por ejemplo, para algunos genes el envejecimiento tiene el efecto contrario: genes como *PGBD4*, *FERD3L*, *TESMIN* y *H2BC1* están regulados a la baja, mientras que genes como *MSGNI*, *BIRC5*, *MDY* y *TXNC2* están regulados al alza. Para otros genes/REs, su expresión no se ve afectada por el envejecimiento en el blastema: *SLC6A3*, *BTBD17*, *UGT1A1*, *ADAM9*, *RTL1*, *NOX1*, *DMRTB1*, *ZNF569*, un LTR Spuma y otros REs desconocidos. En otros casos, el efecto del envejecimiento tiene la misma dirección pero una magnitud significativamente menor (por ejemplo, *AK8*) o mayor (por ejemplo, *CER1*) en el blastema. Finalmente, otros genes como *REG1B*, *CRYGB*, *ROHU_019343* y un transposón con un dominio putativo de DNA polimerasa (*D9C73_028124*), solo se ven afectados por la edad en el blastema, y no en la extremidad.

Además, se detectaron conjuntos de genes/REs que covarían en los blastemas cuando se contrastan con los tejidos de las extremidades (**Figura 6.16**). Un de estos conjuntos constó de genes con una regulación positiva distintiva en el blastema subadulto, incluidos *BHLHA9*, *DDX4*, *XELAEV_18033243MG*, *PARPI_0030888*, *OVOL3*, *CCDC166*, *UCP3*, *MUC5B*, *C1ORF11* y varios genes no anotados (p. ej., *AMEX60DDU001002634*, *AMEX60DD050544*, *AMEX60DD029513*). Estos genes no mostraron desregulación en el blastema de ajolotes adultos. Por otro lado, genes como *CDKL3*, *RGSL2*, *OR8H3*, *ACRBP*, *CA13*, *MORC4*, *FSIP2*, *AQP8*, *CYP2A6* y *S100PBP* formaron un grupo covariante claramente regulado a la baja en el tejido regenerativo de ajolotes subadultos,

6. Resultados

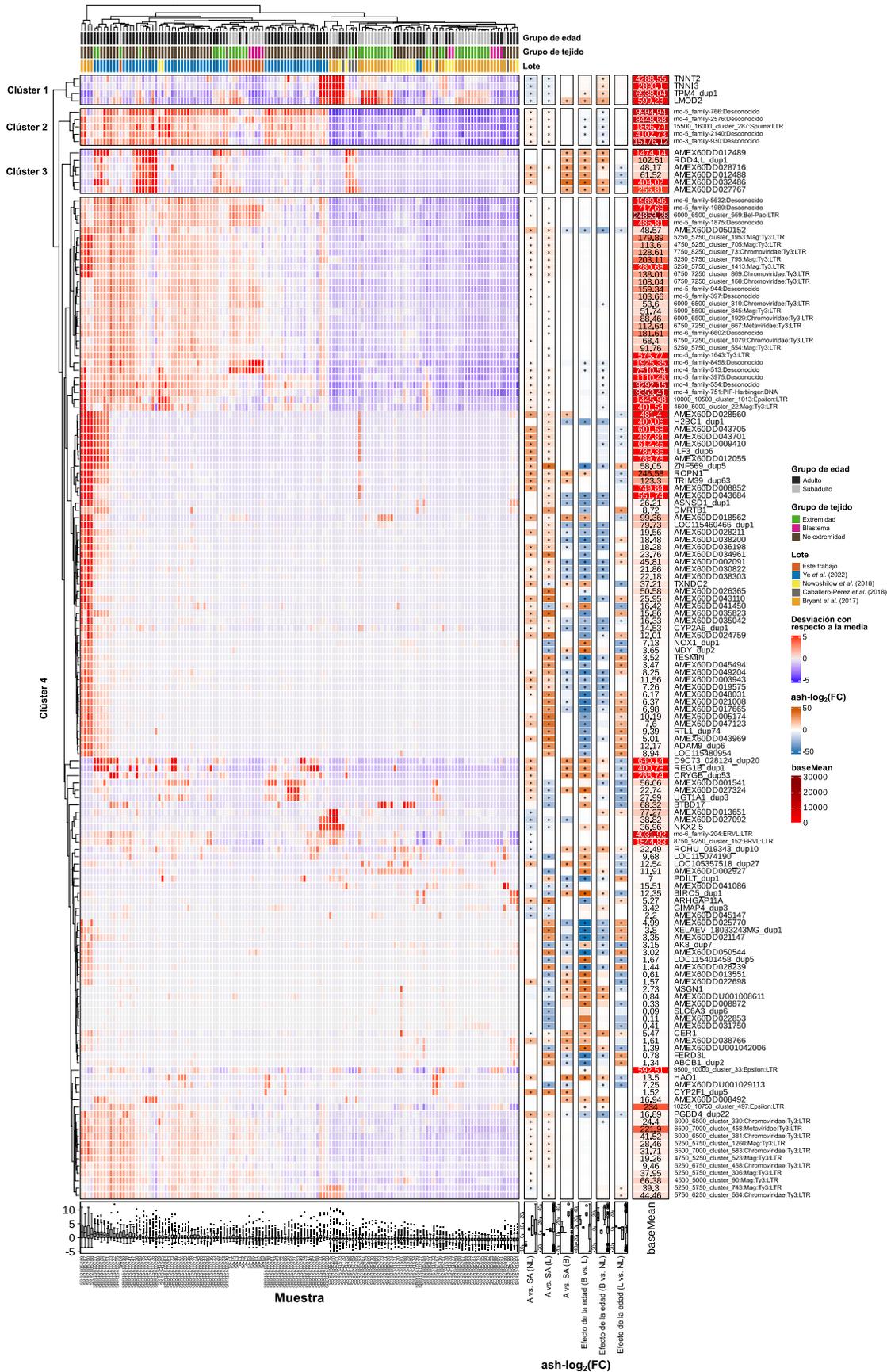


Figura 6.15. Agrupamiento de genes y elementos repetitivos (REs) con base en su desviación con respecto a la media y expresión diferencial en el envejecimiento de muestras globales de ajolotes. Mapa de calor de la desviación de cada gen o RE con respecto a su media (con base en conteos normalizados con VST), dividido en grupos por el dendrograma global. Las columnas con el ash- $\log_2(FC)$ por contraste (*: IHW-adj $p < 0.05$) y baseMean se muestran a la derecha para cada gen/RE.

6. Resultados

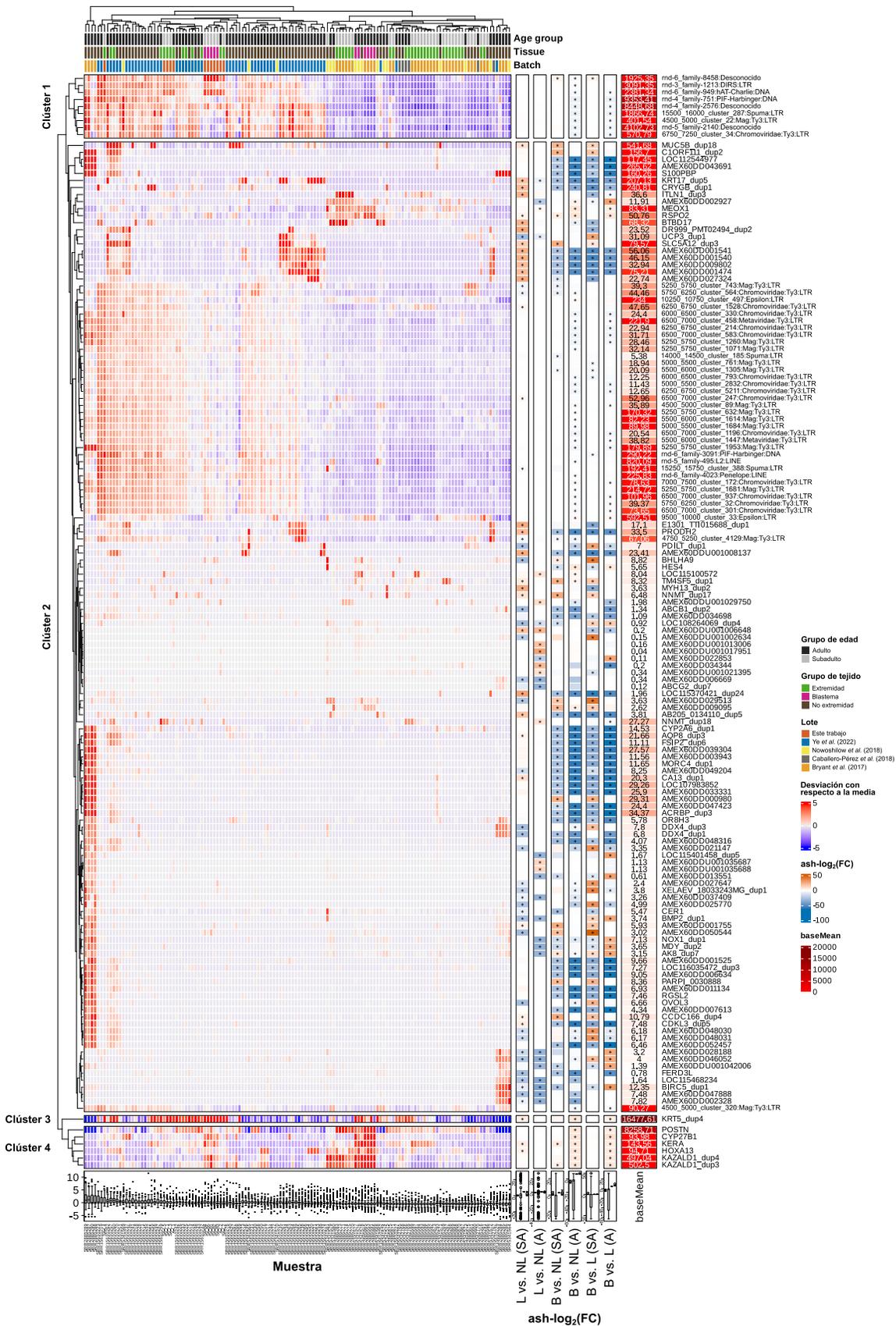


Figura 6.16. Agrupamiento de genes y elementos repetitivos (REs) con base en su desviación con respecto a la media y expresión diferencial en la regeneración de muestras globales de ajolotes. Mapa de calor de la desviación de cada gen o RE con respecto a su media (con base en conteos normalizados con VST), dividido en grupos por el dendrograma global. Las columnas con el ash-log₂(FC) por contraste (*: IHW-adj $p < 0.05$) y baseMean se muestran a la derecha para cada gen/RE.

e incluso más subexpresado en el blastema de los adultos. Por el contrario, las DEREs en estos grupos exhibieron una desregulación menos notable que los genes que codifican proteínas. Tal es el caso de un conjunto distintivo de retrotransposones Ty3 (Chromoviridae, Mag, Metaviridae) que en su mayoría estuvo regulado negativamente en el blastema de ajolotes adultos, con solo unas pocas subfamilias subexpresadas en blastemas subadultos. Entre las principales DEREs, solo dos mostraron una regulación positiva en los blastemas: el repetido desconocido descrito previamente (*rnd-6_family-8458*) en subadultos y un LTR Epsilon (*9500_10000_cluster_33*) en adultos.

A continuación, para abordar el posible papel regulador de las DEREs identificadas sobre genes diferencialmente expresados, se anotó cada locus de cada DERE con su característica genómica/génica más cercana. Curiosamente, la mayoría de los loci de DEREs analizados se ubicaron en regiones intergénicas (~55 %) o dentro de los intrones (~23 %) o regiones 50 kb aguas abajo (~4.5 %) de genes no diferencialmente expresados. Solo una fracción limitada de todos los loci de DEREs se ubicaron en los intrones de DEGs regulados negativamente (~4.4 %) y regulados positivamente (~1.9 %). Por ejemplo, *7750_8250_cluster_73*, una subfamilia Chromoviridae:Ty3:LTR regulada positivamente en el contraste entre las extremidades adultas y subadultas se localiza dentro de un intrón de *HIRA*, un gen que también se sobreexpresa para el mismo contraste (**Figura 6.17**). Sin embargo, ninguno de los DEGs y loci de DEREs que colocalizaron en el genoma compartió un clúster de desviación de la media. Al igual que en el análisis de ajolotes nativos, estos resultados sugieren que la regulación de la expresión génica por parte de los elementos repetitivos es independiente de su proximidad genómica.

6.2.3. La coexpresión de genes y elementos repetitivos en el envejecimiento y la regeneración

Además de su impacto directo en la expresión de genes colocalizados o vecinos, los elementos repetitivos también pueden establecer redes de expresión con otros genes codificantes, contribuyendo a funciones biológicas específicas (Liu *et al.*, 2022). Para explorar más a fondo las funciones potenciales de las DEREs en el envejecimiento y en el desarrollo del tejido regenerativo de la

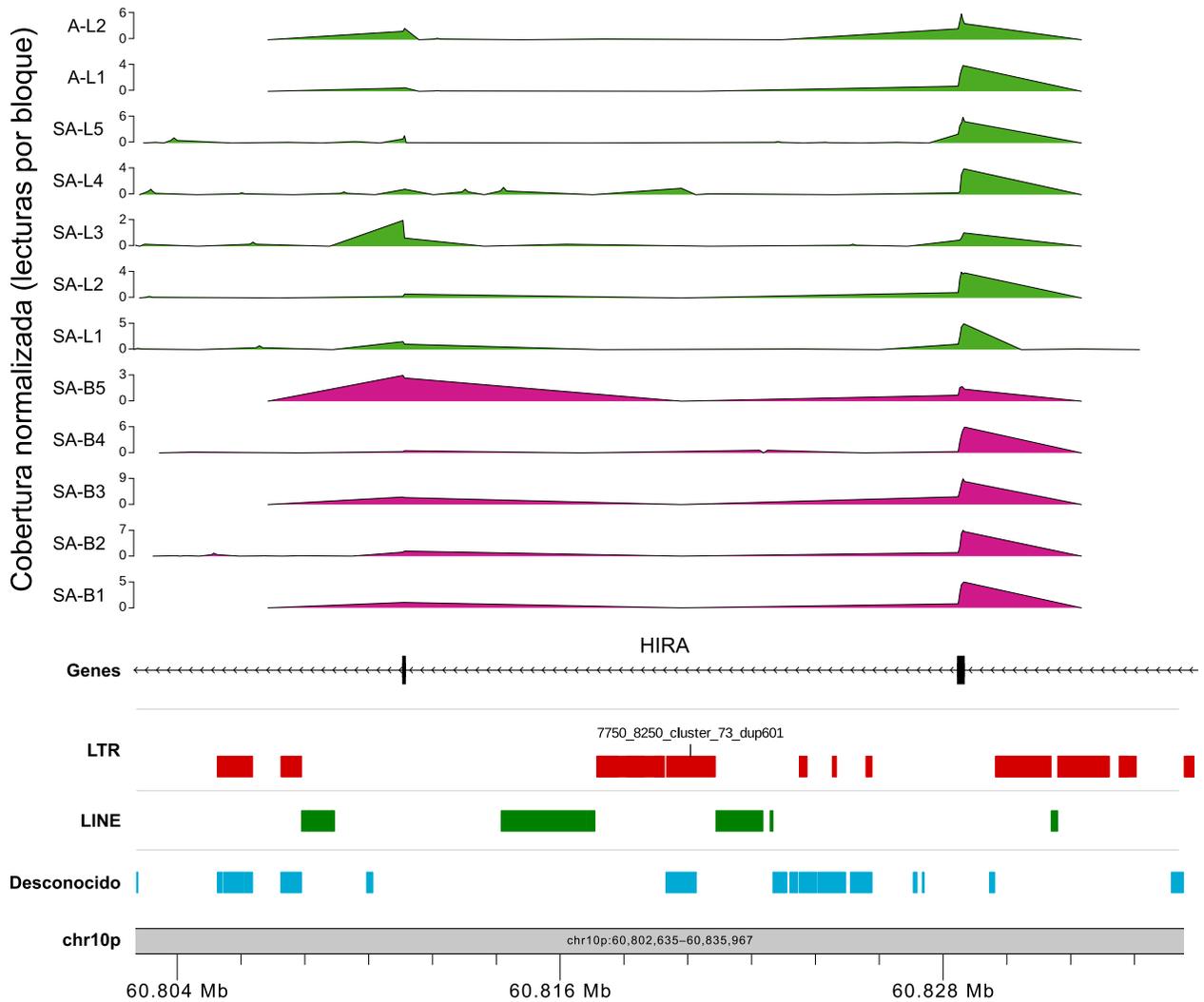


Figura 6.17. Contexto genómico del gen *HIRA* y el elemento repetitivo *7750_8250_cluster_73* (LTR), ambos sobreexpresados en la extremidad de adultos en comparación con la de subadultos. Karyoplot de *7750_8250_cluster_73_dup601* (Chromoviridae:Ty3:LTR), uno de los loci RE regulados positivamente en el contraste de adultos versus subadultos (extremidades) que también se superpone con un intrón de *HIRA*, un gen regulado positivamente para el mismo contraste. La cobertura de lectura de RNA-seq de cada muestra de ajolotes nativos se presenta en la parte superior. SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad.

extremidad, se examinó la correlación entre los genes y los REs de todas las muestras mediante un análisis ponderado de redes de coexpresión de genes (WGCNA). Este análisis reveló 16 módulos de coexpresión, con tamaños que oscilaron entre 126 y 11203 genes/REs (**Figura 6.18**). A continuación, para comprender el significado fisiológico de los módulos, se evaluó la correlación entre los eigengenes de los 16 módulos y los fenotipos de las muestras (**Figura 6.18b**). El eigengen de un módulo determinado se define como su primer componente principal; puede interpretarse como una representación o un promedio de los perfiles de expresión génica dentro del módulo (Langfelder y Horvath, 2008). El fenotipo de una muestra, en este caso, se refiere al grupo de edad (adultos o subadultos) o el tipo de tejido (no extremidad, extremidad o blastema de extremidad).

Los eigengenes de varios módulos estuvieron altamente correlacionados con el fenotipo del grupo de edad, incluido el módulo 5 (negro; 1690 genes; correlación con la edad adulta: $r = -0.72$, BH-adj $p = 1.3 \times 10^{-21}$), módulo 6 (amarillo; 4451 genes; correlación con la edad adulta: $r = -0.64$, BH-adj $p = 7.9 \times 10^{-16}$), módulo 1 (verde; 3948 genes y 2 REs; correlación con la edad adulta: $r = -0.49$, BH-adj $p = 8.5 \times 10^{-9}$) y módulo 16 (gris; 8612 genes y 2 REs; correlación con la edad adulta: $r = -0.45$, BH-adj $p = 1.7 \times 10^{-7}$). Se descubrió que estos módulos también estaban altamente correlacionados con el fenotipo tisular, específicamente los tejidos de las extremidades, aunque solo dos de estos módulos estaban significativamente correlacionados con el blastema de las extremidades: módulo 5 ($r = 0.27$, BH-adj $p = 0.00552$), y módulo 16 ($r = 0.22$, BH-adj $p = 0.027$). Por otro lado, solo dos de los 16 módulos contuvieron REs coexpresados: el módulo 1 incluyó las subfamilias *13750_14250_cluster_243:Spuma:LTR* y *5000_5500_cluster_187:Mag:Ty3:LTR*, mientras que el módulo 16 incluyó la subfamilia *6250_6750_cluster_443:Chromoviridae:Ty3:LTR* y un RE desconocido (*rnd-3_family-511*) (**Figura 6.18c**). En el **Cuadro D.1** se presenta la lista de los DEGs y DEREs con mayor tasa de cambio con base en los contrastes de expresión diferencial, así como el módulo del WGCNA al que pertenecen.

Luego, para cuantificar las asociaciones entre genes/REs individuales y los fenotipos de interés (grupo de edad o tejido de blastema), se calculó su significancia génica (GS), definida como el valor absoluto de la correlación entre cada gen/RE y el fenotipo, y su membresía intramodular

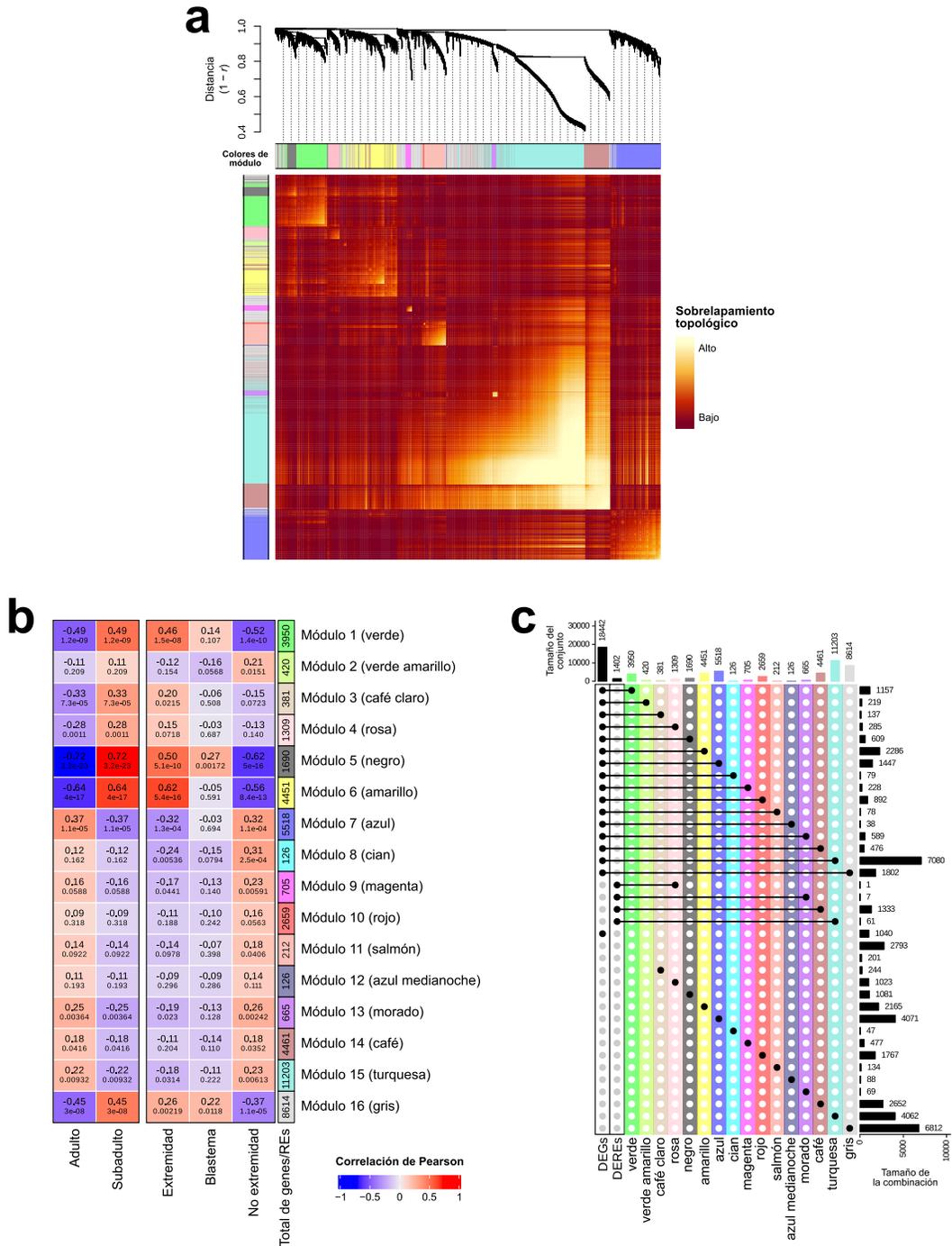


Figura 6.18. Coexpresión de genes y elementos repetitivos (REs) y su asociación con el envejecimiento y la regeneración en el ajolote. (a) Mapa de calor del sobrelapamiento topológico en la red de genes y REs. Cada fila y columna corresponde a un gen/RE, el color claro indica un sobrelapamiento topológica alta y el rojo progresivamente más oscuro denota un sobrelapamiento topológica más baja. Los cuadrados más claros a lo largo de la diagonal corresponden a módulos de coexpresión. El dendrograma de genes/REs y la asignación de módulos se muestran en la parte superior. **(b)** Mapa de calor de la correlación de Pearson entre módulos y fenotipos (grupo de tejido o edad). Cada celda muestra el valor de correlación en la parte superior y el BH-adj *p* asociado debajo. **(c)** Gráfico *UpSet* de las intersecciones entre genes/REs del módulo y el conjunto completo de genes y REs expresados diferencialmente detectados previamente mediante análisis de expresión diferencial.

6. Resultados

(MM), definida como la correlación entre el eigengen del módulo y el perfil de expresión del gen/RE (Langfelder y Horvath, 2008). Se descubrió que la GS y la MM estaban altamente correlacionadas en los módulos 5 (negro), 6 (amarillo) y 1 (verde), lo que denotó que los genes/REs asociados de manera muy significativa con el grupo de edad del ajolote también eran los elementos más importantes de sus módulos (**Figura 6.19a**). Si bien esto fue cierto para los módulos correlacionados con el grupo de edad, los módulos asociados con el blastema mostraron una correlación mínima entre GS y MM (**Figura 6.19b**), lo que podría indicar que solo un submódulo de genes/REs se relaciona con el blastema y que esta asociación módulo-fenotipo requiere posterior validación.

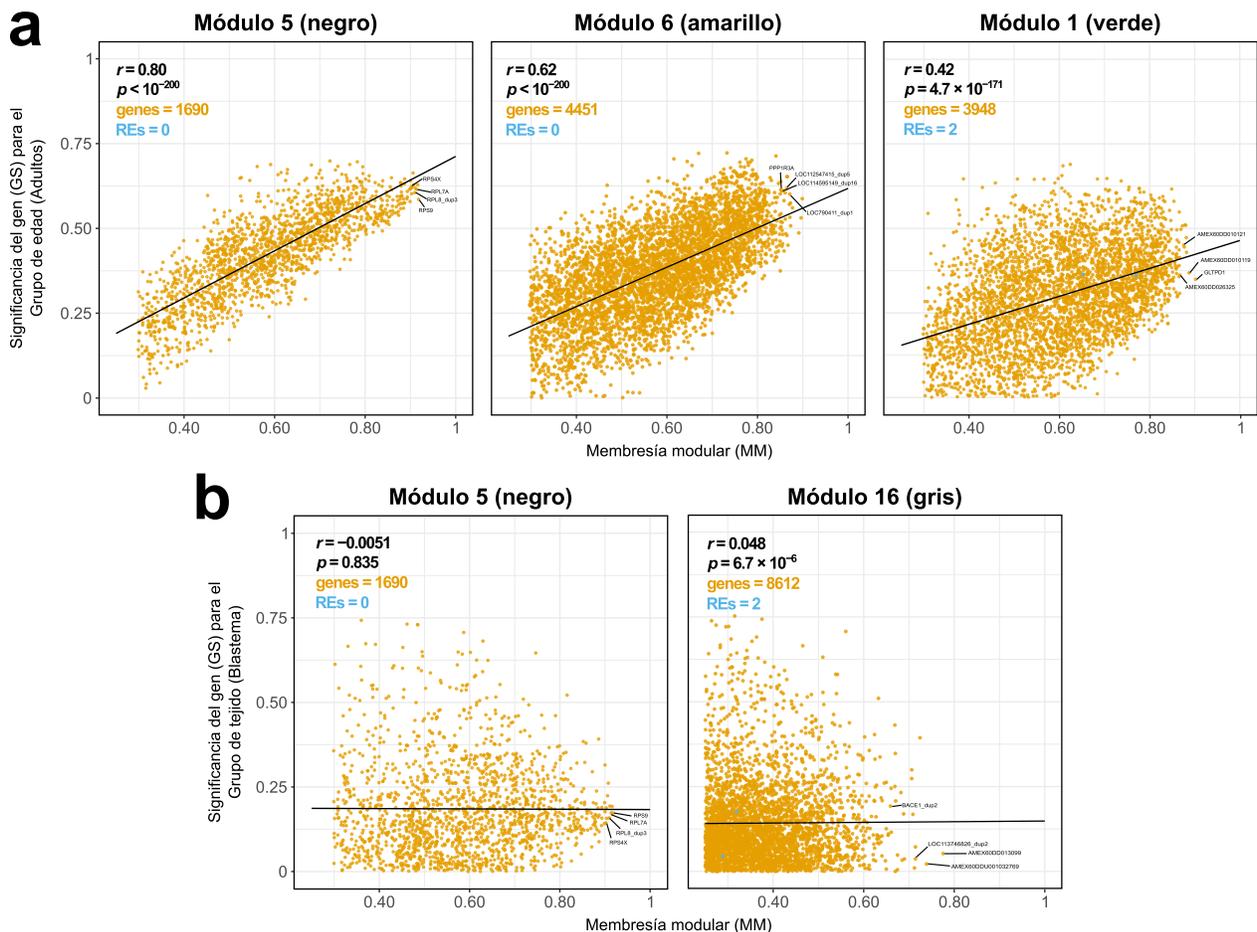


Figura 6.19. Significancia para el fenotipo (GS) y membresía intramodular (MM) de genes y elementos repetitivos en módulos de coexpresión. (a) Diagramas de dispersión de MM versus GS en los módulos con mayor correlación con el grupo de edad. (b) Diagramas de dispersión de MM versus GS en los módulos con mayor correlación con el blastema de extremidad.

A continuación, se realizó un análisis de sobrerepresentación (ORA) para determinar si estos módulos estaban enriquecidos significativamente por ontologías génicas conocidas (**Figura 6.20**). Entre las 681 vías significativamente enriquecidas que se detectaron en el módulo 5 (negro), las principales estaban relacionadas con los componentes del ribosoma citosólico, el metabolismo del rRNA y el mRNA, la iniciación y regulación de la traducción, el direccionamiento de las proteínas a la membrana y el retículo endoplásmico, y la regeneración del hígado. El módulo 6 (amarillo) mostró una sobrerepresentación de 1 416 términos GO, asociados principalmente con la morfogénesis, diferenciación y función del músculo estriado (deslizamiento de filamentos de actina-miosina, regulación de la contracción, etc.), así como otros términos involucrados en el desarrollo como los constituyentes estructurales de la matriz extracelular, la unión a glicosaminoglicanos y la diferenciación de condrocitos. Se identificó un conjunto de 1 820 términos significativamente enriquecidos en el módulo 1 (verde), en el que las vías predominantes estaban implicadas en las respuestas inmunes e inflamatorias, la supervivencia y proliferación celular y el desarrollo de la piel/queratinocitos. En particular, los términos más significativos de este módulo estuvieron involucrados en la regulación negativa de la señalización de la quinasa I-kappaB/NF-kappaB, la respuesta inmune, los procesos virales y la producción de citocinas, pero también en la regulación positiva de la vía de señalización apoptótica. El módulo 16 (gris) se enriqueció significativamente en 60 términos GO, incluida la digestión, la membrana de gránulos de zimógeno, la actividad N-metiltransferasa (principalmente la dependiente de SAM y específica de H3-K4 o H3-K36), los procesos relacionados con la meiosis (regulación, conversión de genes, recombinación, reparación de rupturas de doble cadena (DSBs), etc.) y la regulación positiva del reemplazo del tejido conectivo.

Posteriormente, para identificar los elementos centrales o *hub* de cada módulo, se seleccionaron los genes/REs con valores de conectividad intramodular (**Figuras 6.19 y 6.21**) y *maximal clique centrality* (MCC) (**Figura 6.21**) más altos.

En concordancia con los resultados del ORA, se encontró que la mayoría de los genes *hub* en el módulo 5 (negro) codificaban proteínas de las subunidades ribosómicas pequeñas y grandes (*RPS3*, *RPLP2*, *RPS9*, *RPL23*, etc.), así como un factor eucariota de elongación de la traducción

6. Resultados

involucrado en la transferencia de tRNA aminoacilados al ribosoma (*EEF1B2*) y un gen no anotado *AMEX60DD030462* (**Figura 6.21**). También se anotaron las interacciones funcionales y físicas de los genes *hub* con base en los datos de STRING y se observó que todas las proteínas en este módulo, excepto el gen no anotado, tienen interacciones reportadas previamente en estudios de coexpresión, minería de textos, u otras bases de datos, etc.

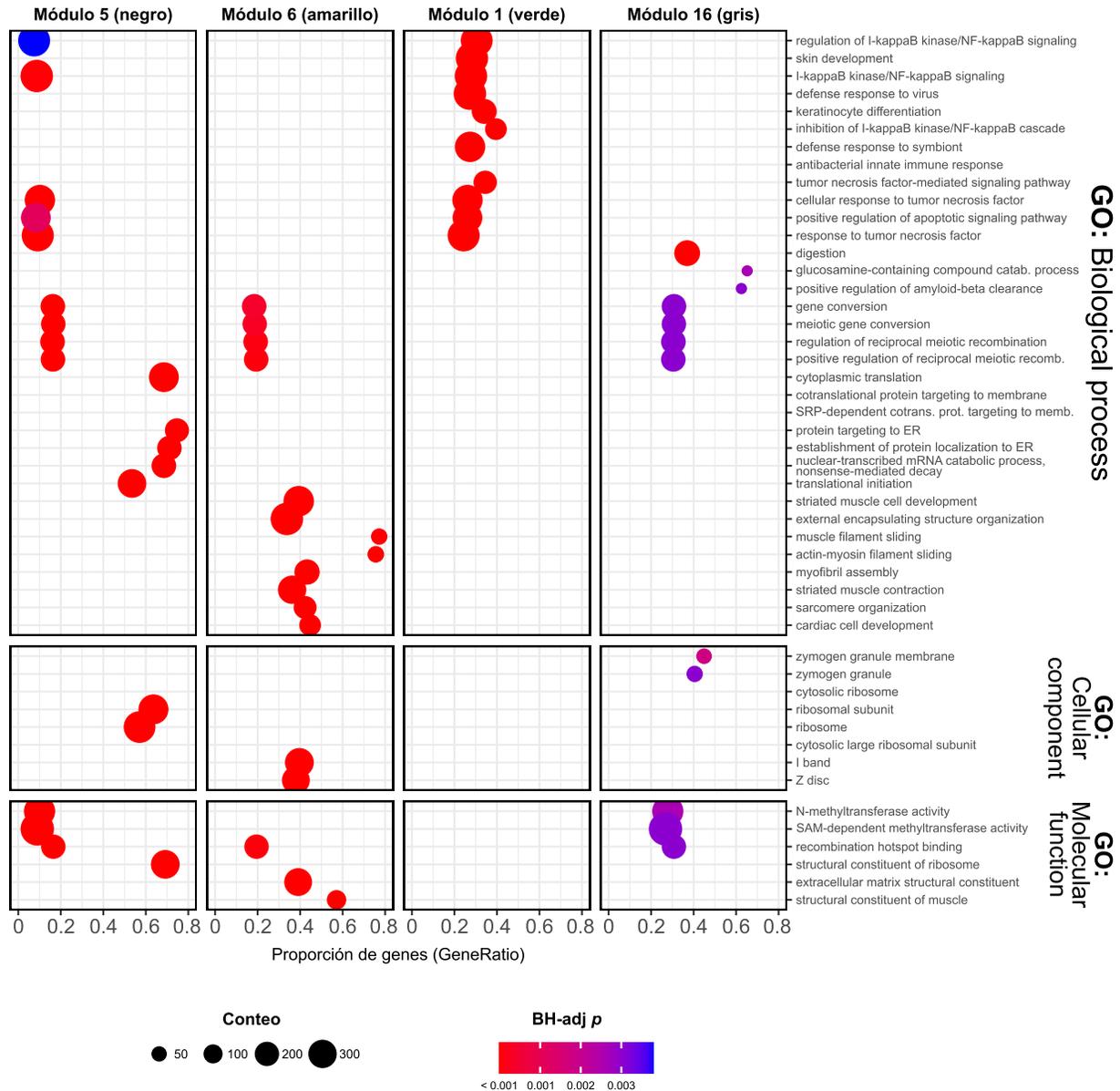


Figura 6.20. Enriquecimiento de vías biológicas en los módulos de coexpresión con mayor correlación con el grupo de edad o tejido regenerativo en ajolotes. El diagrama de puntos muestra los términos de ontología génica (GO) y las vías de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) significativamente enriquecidos en cada módulo de coexpresión mediante un análisis de sobrerrepresentación (ORA).

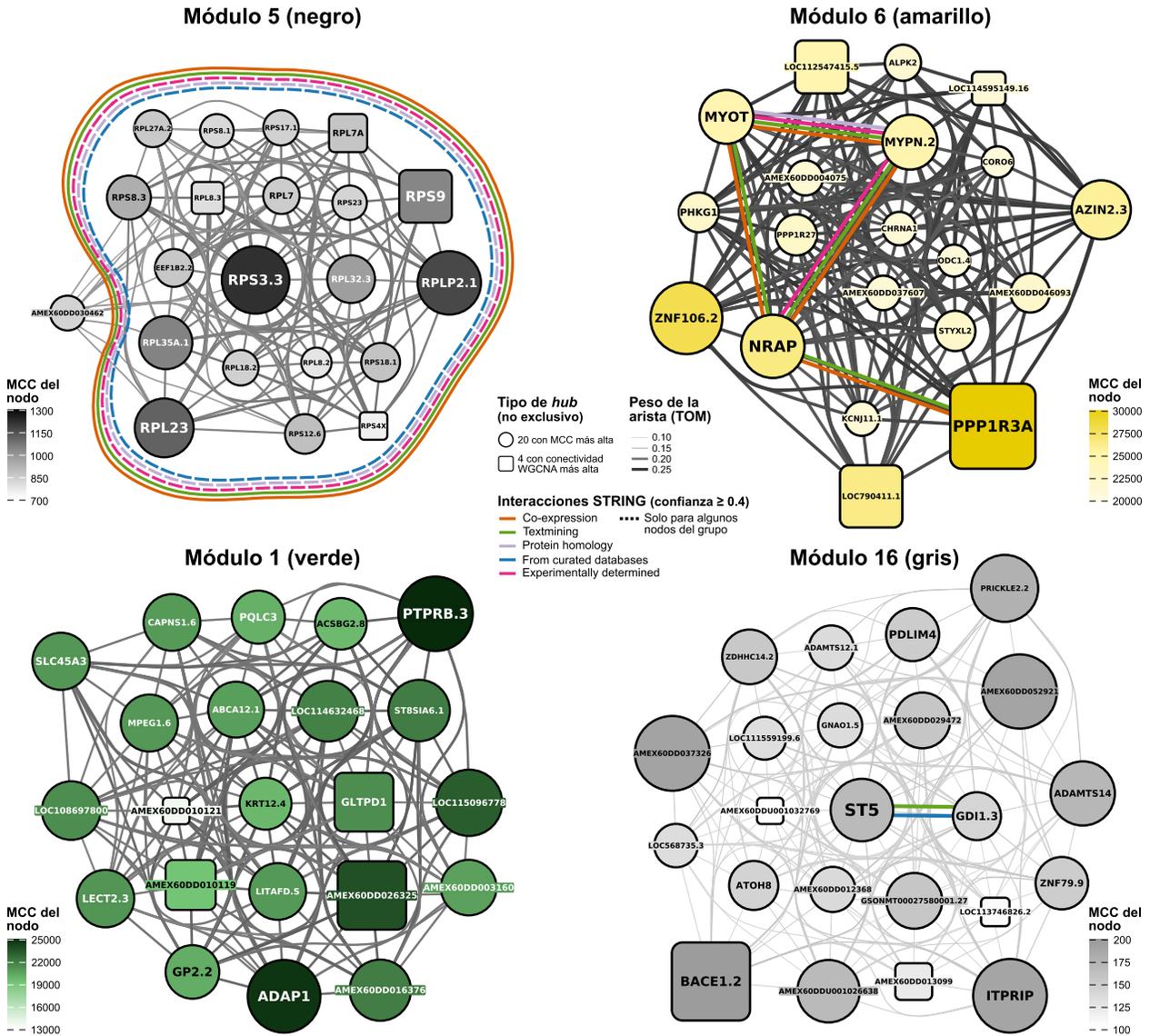


Figura 6.21. Genes y elementos repetitivos (REs) centrales (*hubs*) en los módulos de coexpresión con mayor correlación con el grupo de edad o tejido regenerativo en ajolotes. Se muestran las subredes de coexpresión con los genes o REs *hub* en los módulos 1 (negro), 6 (amarillo), 1 (verde) y 16 (gris). Los *hubs* fueron seleccionados en función de sus puntajes de conectividad intramodular y *maximal clique centrality* (MCC). Los sufijos numéricos de los símbolos genéticos indican genes duplicados. Las asociaciones proteicas físicas y funcionales reportadas para estos genes se muestran como aristas codificadas por colores.

En el módulo 6 (amarillo), el gen con el puntaje de MCC más alto fue *PPP1R3A*, una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 (PP1) que actúa sobre el glucógeno y es esencial para la división celular, la regulación del metabolismo del glucógeno, la contractilidad muscular y la síntesis de proteínas (**Figura 6.21**). Otros genes centrales en este módulo también fueron relacionados con el desarrollo y la actividad muscular (*NRAP*, *ZNF106*, *MYOT*, etc.), lo que, además de coincidir con los resultados del ORA, también concuerda con los reportes de que *PPP1R3A*, *MYOT*, *MYPN* y *NRAP* se coexpresan. Adicionalmente, se identificaron dos interactores previamente reportados, la ornitina descarboxilasa 1 (*OCD1*) y su homólogo enzimáticamente inactivo el inhibidor de antizimas 2 (*AZIN2*) como genes *hub* en este módulo. Aunque no se detectó ningún RE de la biblioteca de repetidos coexpresado como tal en el módulo 6, se encontraron tres genes *hub* que codifican dominios proteicos (putativos) característicos de los elementos retrotransponibles. Específicamente, *LOC790411* contiene dominios de transposasa y transcriptasa inversa endonucleasa de LINE-1, *LOC114595149* contiene una exonucleasa-endonucleasa-fosfatasa (EEP) y una transcriptasa inversa (RT) de retrotransposón/retrovirus no LTR, y *LOC112547415* contiene un dominio RT de DIRS-1 y una ribonucleasa HI de DIRS-1. Estos hallazgos indican que varios retrotransposones podrían servir como *hubs* y participar indirectamente en la red de coexpresión genética que se encarga de la regulación y función del desarrollo muscular que se suprime con el envejecimiento en el ajolote.

Con base en los puntajes de MCC, el gen *hub* más importante en el módulo 1 (verde) fue el receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo B (*PTPRB*), que desempeña un papel en la remodelación de los vasos sanguíneos durante el desarrollo, el mantenimiento y la angiogénesis embrionarios. Los PTBs también regulan el crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica. Curiosamente, *PTPRB* es esencial para la función adhesiva de la cadherina del epitelio vascular CDH5 en las células endoteliales, y aquí se identificó otro gen *hub* en este módulo (*LOC115096778*) que codifica una proteína similar a la cadherina implicada en la morfogénesis celular y en la adhesión celular dependiente de calcio a través de moléculas de la membrana plasmática. En general, la mayoría de los genes centrales en el módulo 1 estuvieron relacionados con la señalización celular (*ADAP1*, *ST8SIA6*), el tráfico de vesículas, la composición integral de mem-

branas (*PQLC3*, *LOC114632468*), la interacción célula-patógeno y la quimiotaxis (*GP2*, *LECT2*), los condrocitos y osteoblastos (*LECT2*), entre otras funciones no anotadas (*AMEX60DD026325*) (**Figura 6.21**).

La betasecretasa 1 (*BACE1*), un procesador proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP), fue el gen *hub* más importante en el módulo 16 (gris), el cual mostró una correlación positiva significativa con el tejido regenerativo. También se identificó una alta interacción con *PRICKLE2*, un gen de desarrollo neuronal que ha sido implicado en la inhibición de la señalización Wnt/PCP/JNK activada por APP (Sun *et al.*, 2020). Otros genes no anotados también mostraron una puntuación MCC (*AMEX60DD037326*, *AMEX60DD052921*) o conectividad (*AMEX60DD013099*) alta. Además, se detectaron otros *hubs* involucrados en la señalización del calcio intracelular (*ITPRIP*), la formación de fibras de colágeno (*ADAMTS14*) y la regulación de la actividad MAPK1/ERK2 quinasa (*ST5*). Importantemente, también se descubrieron genes *hub* con dominios proteicos de LTR y no LTR, y un potencial regulador de su transcripción específica de RNA pol II (*ZNF79*). Específicamente, *LOC113746826* contiene dominios de retropepsina, RT de LTR, RNasa HI de Ty3, transposasa IS481 e integrasa, mientras que *LOC568735* comprende dominios EEP y RT no LTR. Junto con los resultados del ORA presentados anteriormente, estos hallazgos sugieren que los retrotransposones y los factores de transcripción podrían servir como *hubs* y participar indirectamente en las redes de reemplazo del tejido conectivo, proteólisis amiloide y vías de N-metiltransferasa que se activan durante la regeneración en el ajolote (**Figura 6.21**).

7. Discusión

7.1. Los genes codificantes de proteínas durante la regeneración de la extremidad del ajolote

Múltiples estudios han identificado genes codificantes de proteínas que desempeñan un papel en la regeneración de la extremidad en *Ambystoma mexicanum*. En este trabajo nos enfocamos en la expresión de elementos repetitivos y genes codificantes con un papel reportado en la regeneración de las extremidades de vertebrados. Observamos que existe un patrón predominante de subexpresión de genes entre blastemas de 10 días y tejidos de extremidad de los ajolotes, representado en su mayor parte por la supresión de vías del desarrollo muscular, lo que corrobora estudios previos (Monaghan *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2013; Voss *et al.*, 2015, 2018; Dwaraka *et al.*, 2019; Sibai *et al.*, 2019). Entre estos genes, *NNMT* (del Moral-Morales *et al.*, 2023; Mahapatra *et al.*, 2023), *SMPD3* (Sousounis *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2022), *PRSS35* (Shanmugasundaram, 2015), *SRPK3* (Gerber *et al.*, 2018) y varios otros ya tienen una función o implicación reportada en procesos regenerativos.

Además, identificamos una regulación positiva significativa de genes que previamente habían estado implicados en la regeneración de las extremidades del ajolote. Por ejemplo, la interleucina 11 (*IL11*) mostró una sobreexpresión significativa en el tejido regenerativo, posiblemente relacionada con su papel en la respuesta inflamatoria (Gerber *et al.*, 2018). También podría estar implicada en la reprogramación celular o actuar como factor limitante de la cicatrización fibrótica durante la regeneración del tejido, como se ha reportado para *Danio rerio* (Allanki *et al.*, 2021). Sin embargo, los resultados presentados aquí muestran que la expresión de *IL11* tiene un papel a los 10 dpa, por lo que se expresa diferencialmente más allá de los 3-5 dpa para los que se había descrito anteriormente (Gerber *et al.*, 2018). Otro gen que hallamos significativamente sobreexpresado en el tejido regenerativo, *ODAM*, ha sido descrito como un marcador en fibroblastos en trayectoria hacia células similares a

osteoblastos del blastema en fase de yema intermedia (Leigh *et al.*, 2018), y también en ameloblastos, odontoblastos, osteoblastos y diversas células cancerosas (H.-K. Lee *et al.*, 2012). Por otro lado, nosotros encontramos que los genes de dos proteínas poco estudiadas, las proteínas adaptadoras D (SHD) y F (SHF) que contienen el dominio SH2, también están reguladas positivamente en el blastema de 10 dpa. Algunos estudios han implicado a SHF como reguladora de la apoptosis en fibroblastos de ratón (Lindholm *et al.*, 2000). Considerando el papel descrito de la apoptosis y los procesos de remodelación ósea durante la regeneración (Mescher *et al.*, 2000; Guimond *et al.*, 2010; Guerin *et al.*, 2021; del Moral-Morales *et al.*, 2023), estas proteínas adaptadoras son un punto focal prometedor para futuras investigaciones en el ajolote. Adicionalmente, detectamos de manera novedosa que el miembro básico de la familia hélice-bucle-hélice A9 (*BHLHA9*), que codifica un factor de transcripción involucrado en la regulación de la apoptosis durante el desarrollo de autópodos (Schatz *et al.*, 2014; Petit *et al.*, 2017) también está significativamente sobreexpresado en el blastema de la extremidad. Estudios previos han reportado que *BHLHA9* regula la formación de la cresta apical ectodérmica (AER) durante el desarrollo de las extremidades/dedos del ratón mediante la regulación de la expresión de genes como *TP63* y *FGF8*, que sirven como moduladores clave de la apoptosis y la formación de las extremidades (Mahmood *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1999; A. Yang *et al.*, 1999; Moon y Capecchi, 2000; Kataoka *et al.*, 2018). Hasta el momento *BHLHA9* no tiene un papel descrito en el blastema del ajolote y, por lo tanto, es un candidato prometedor para futuras investigaciones sobre el proceso apoptótico durante la regeneración de las extremidades en *A. mexicanum*.

7.2. La predominante supresión de elementos repetitivos durante la regeneración de la extremidad del ajolote

Aunque cada vez se reconoce más el papel de los elementos transponibles en el desarrollo, su contribución a la regeneración animal recién empieza a recibir la debida atención (Mashanov *et al.*, 2012b). La actividad de los elementos repetitivos y su expresión diferencial durante la regeneración solo se han estudiado en unos pocos modelos animales, incluyendo *Drosophila* (Azpiazu y Morata, 2022), el

pepino de mar de roca marrón *Holothuria glaberrima* (Mashanov *et al.*, 2012a) y *A. mexicanum* (Zhu, Kuo *et al.*, 2012). En el caso del ajolote, Zhu, Kuo *et al.* (2012) reportaron tanto una sobreexpresión como una mayor retrotransposición de LINE-1 en tejidos desdiferenciados del blastema. También informaron que otros TEs putativos y piRNAs relacionados con LINE-1 parecen expresarse o activarse transcripcionalmente en la extremidad en regeneración, con diferentes dinámicas o perfiles de expresión. Si bien los autores sugieren que la reactivación del retrotransposón LINE-1 puede servir como marcador de la desdiferenciación celular en la etapa temprana de la regeneración de las extremidades, no proponen una función precisa ni describen la expresión de otros elementos durante este proceso. A diferencia de estos estudios previos, en nuestro trabajo caracterizamos los perfiles de expresión de todos los elementos repetitivos modelados hasta el momento durante la regeneración de la extremidad en *A. mexicanum*. Observamos que en los blastemas (10 dpa) de ajolotes nativos (cepa Xochimilco), solo tres retrotransposones Mag y tres Chromoviridae (superfamilia Ty3) y un repetido sin anotar exhiben signos de sobreexpresión significativa. Adicionalmente, se reportó que solo tres retrotransposones Mag, tres Chromoviridae y dos repetidos no anotados están regulados negativamente en el blastema de ajolotes nativos. Curiosamente, en contraste con los resultados de Zhu, Kuo *et al.* (2012), no se detectamos expresión diferencial significativa de ninguna subfamilia de LINE-1 en el blastema de ajolotes nativos, pero sí en el contexto del envejecimiento. Quizás, la sobreexpresión de LINE-1 durante la regeneración reportada por Zhu, Kuo *et al.* (2012) sea dependiente de la etapa de desarrollo del blastema, ya que los autores analizaron blastemas de 2 a 5 dpa, a diferencia de los 10 dpa estudiados en el presente trabajo. También, es posible que, debido a la gran cantidad de loci de LINE-1 en el genoma del ajolote, la expresión del locus de LINE-1 particular descrito por Zhu, Kuo *et al.* (2012) no se haya detectado en nuestro análisis a nivel de subfamilia.

Al incorporar muestras de tejido de ajolote de múltiples estudios, también reportamos que durante la regeneración el blastema sufre una mayoritaria subexpresión de retrotransposones, principalmente de la superfamilia Ty3 de las familias Chromoviridae y Mag, con respecto a las muestras de la extremidad. De hecho, se detectaron solo dos REs regulados positivamente, un LTR Epsilon en adul-

tos (*9500_10000_cluster_33*) y un elemento de clase desconocida en subadultos (*rnd-6_family-8458*). Estos hallazgos son compatibles con la idea de que la expresión diferencial de los retroelementos durante la regeneración es un fenómeno no específico y a gran escala (Mashanov *et al.*, 2012b), en otras palabras, que los REs experimentan una desregulación global después de una lesión y durante el desarrollo del nuevo tejido.

Sin embargo, la observación presentada aquí de una subexpresión más predominante que la sobreexpresión no concuerda con la visión tradicional del patrón de desregulación de los REs durante la regeneración (Mashanov *et al.*, 2012b). Esta visión plantea que los transposones solo hacen uso de la activación global de la cromatina inducida por una lesión y de la desrepresión transcripcional, es decir, una reducción general del silenciamiento epigenético que conduce a un estado similar a la línea germinal, para amplificarse y así aumentar sus probabilidades de sobrevivir a la lisis de su célula hospedera (Mashanov *et al.*, 2012b; Zhu, Kuo *et al.*, 2012). Por el contrario, la supresión obvia de los transposones Ty3 que se describe en este trabajo sugiere una regulación epigenética mucho más fina de la expresión de los transposones durante la regeneración de las extremidades. Además, concuerda con la hipótesis propuesta por Angileri *et al.* (2022) de que la represión de la actividad de los elementos transponibles es necesaria para la regeneración de tejidos, que empieza tras una lesión y alcanza su máximo durante la activación de células troncales y la expansión clonal.

7.2.1. Los posibles mecanismos de regulación de los retrotransposones durante la regeneración

Posiblemente, la regulación negativa de LTRs en el blastema podría ser causada por procesos similares a los mecanismos de silenciamiento de TEs observados durante el desarrollo de la línea germinal de los mamíferos, como la adición o eliminación de modificaciones covalentes al DNA y las histonas (Cedar y Bergman, 2009; Crichton *et al.*, 2014). Por ejemplo, previamente se ha reportado que los elementos MMVL30 y MuLV, que son miembros de la familia ERV1 de retrotransposones LTR, están regulados transcripcionalmente a la baja por medio de la metilación del DNA (Brunmeir *et al.*, 2010) o por la redistribución de la modificación de histonas asociada a Polycomb (Reddington

et al., 2013) en fibroblastos embrionarios de ratón. Además, la metilación del DNA podría ejercer sus efectos represivos sobre la transcripción de TEs al interferir estéricamente con los factores de transcripción (TFs), por ejemplo, asociándose a sus sitios de unión afines localizados en las regiones reguladoras proximales de algunos promotores (Wiench *et al.*, 2011; Crichton *et al.*, 2014). Otra posibilidad es que los TFs que silencian TEs, como algunos C2H2-ZNFs (de Tribolet-Hardy *et al.*, 2023), podrían unirse preferentemente a sitios CpG metilados (Sasai *et al.*, 2010) dentro de los promotores de TEs y así aumentar su represión. Alternativamente, las proteínas de unión a metil-CpG, como MECP2 o el complejo correpresor SIN3A, podrían influir en la accesibilidad del TF o en la estructura de la cromatina en los sitios genómicos que contienen esta marca epigenética (Lewis *et al.*, 1992; Meehan *et al.*, 1992; Hendrich y Bird, 1998; Nan *et al.*, 1998; Prokhortchouk *et al.*, 2001; Crichton *et al.*, 2014). Sin embargo, aún se necesitan más estudios para identificar la función específica de cada subfamilia de elementos repetitivos y los mecanismos epigenéticos responsables de su silenciamiento durante la regeneración de las extremidades en el ajolote.

7.3. Los efectos del envejecimiento sobre la expresión de elementos repetitivos en el ajolote

Como muchos cambios fisiológicos, el envejecimiento muestra una fuerte asociación con la desregulación de la transcripción (Stegeman y Weake, 2017). Varios estudios en múltiples modelos han reportado que los elementos repetitivos se acumulan progresivamente con la edad. Por ejemplo, estudios en ratones, moscas y otros organismos han demostrado que los REs activos o transponibles pueden contribuir al proceso de envejecimiento (Van Meter *et al.*, 2014; H. Chen *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2016; De Cecco *et al.*, 2019), y la acumulación de transcritos de REs está implicada en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (W. Li *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2018; LaRocca *et al.*, 2019; Saldi *et al.*, 2019). Más aún, los aumentos en la expresión de transcritos de REs se han utilizado para predecir con precisión la edad biológica en fibroblastos humanos y muestras de *C. elegans* (LaRocca *et al.*, 2020). Hasta ahora, no se han realizado investigaciones sobre cómo el envejecimiento afecta la expresión de los REs en *Ambystoma mexicanum*. Los análisis

que se presentan aquí demuestran un patrón comparable al descrito para otras especies, en el que las extremidades y otros tejidos (branquias, gónadas, corazón, riñones, hígado, pulmón, etc.) del ajolote experimentan una importante regulación positiva de REs relacionada con la edad, dominada principalmente por retrotransposones LTR de la superfamilia Ty3.

Los retrotransposones LTR como Ty3 contienen dos repeticiones terminales largas (LTRs) y codifican proteínas con actividades Gag, proteasa, transcriptasa inversa e integrasa, todas las cuales son cruciales para su retrotransposición (Levin y Moran, 2011). Un perfil de regulación positiva de los Ty3 como el que se presenta en este trabajo para ajolotes envejecidos puede reflejar una mayor transcripción por parte de la RNA polimerasa II del hospedero (una sobreexpresión de mRNAs de TEs) o un aumento en el número de inserciones genómicas del cDNA de los TEs, lo que a su vez luego aumentaría la tasa de eventos de transcripción de TEs en el genoma. Algunos estudios basados en secuenciación del genoma completo de núcleos individuales en *Drosophila* han revelado que la sobreexpresión endógena de TEs durante el envejecimiento no conduce necesariamente a nuevas inserciones genómicas (Schneider *et al.*, 2023). Además, la reducción de la expresión de dos retrotransposones Ty3 diferentes (*412* y *Roo*) extiende la esperanza de vida sin aumentar la movilización de los TEs, lo que sugiere que la presencia de mRNAs de TEs o incluso intermediarios de DNA, y no la inserción, es el factor perjudicial para la función celular y animal (Schneider *et al.*, 2023). Este también podría ser el caso para la regulación positiva de TEs relacionada con la edad que se observa en el ajolote; sin embargo, estos dos escenarios son indistinguibles mediante los análisis de RNA-seq que se presentan en este estudio.

La actividad de los retrotransposones puede regular la expresión génica e introducir eventos tanto beneficiosos como catastróficos en el genoma del hospedero. Los mecanismos por los cuales los TEs pueden afectar las redes reguladoras de genes incluyen: la adición de sitios de unión de factores de transcripción, promotores, potenciadores, sitios de empalme y terminación; producción de RNA no codificantes reguladores; alteración de la organización tridimensional de la cromatina; cooptación/exaptación/domesticación de secuencias codificantes derivadas de TEs como nuevas proteínas efectoras transcripcionales; y consecuencias colaterales de los mecanismos de silenciamiento

de TEs (Branco y Chuong, 2020; Fueyo *et al.*, 2022; Gebrie, 2023). En general, estos procesos conducen a patrones de empalme de genes alternativos y cambios en los perfiles de expresión génica que subyacen a algunas enfermedades (Sinibaldi-Vallebona *et al.*, 2006; J.-M. Chen *et al.*, 2010; Montoya-Durango y Ramos, 2010; Zhu, Kuo *et al.*, 2012). La comparación presentada en este trabajo entre ajolotes adultos nativos y sus contrapartes más jóvenes reveló un posible grupo de genes/TEs regulado positivamente con el envejecimiento que involucra un transcrito de LINE-1 (*ORF2*), un retrotransposón no LTR (*LOC115370421*), un supresor de tumores (Mollenhauer *et al.*, 1997) y detector inmunológico de repeticiones virales (Z. Wu *et al.*, 2006) (*DMBT1*), un supresor de la metilación del DNA y las histonas sobreexpresado en cánceres humanos (Ulanovskaya *et al.*, 2013) (*NNMT*) y dos factores de transcripción de unión al DNA (*ZNF665* y *ZNF501*). Entre estos, *ORF2* es particularmente interesante porque proporciona la actividad de transcriptasa necesaria para la transcripción inversa cebada por el objetivo del mRNA de LINE-1, un paso crucial en su retrotransposición (Dombroski *et al.*, 1994; Sassaman *et al.*, 1997; Rangwala *et al.*, 2009). También importante es el gen *ZNF665*, que codifica para una proteína con dedos de zinc y dominio KRAB, ya que trabajos anteriores han revelado que muchas proteínas de dedos de zinc (KZFPs) con el dominio de caja asociado a Krüppel (KRAB) reconocen secuencias embebidas en TEs como sus dianas genómicas, y que las KZFPs pueden suprimir la actividad de los TEs o facilitar la cooptación de su potencial regulatorio en beneficio del hospedero (Barnada *et al.*, 2022; de Tribolet-Hardy *et al.*, 2023). De hecho, en humanos, *ZNF665* tiene objetivos de la familia LINE-1/L1, específicamente, los elementos L1M3f y L1MA4 (de Tribolet-Hardy *et al.*, 2023). La regulación positiva conjunta de estos genes podría significar que una sobreexpresión de *NNMT* inducida por el envejecimiento puede causar una reducción de los niveles de metilación en los sitios de unión a KZFPs dentro de los promotores de algunos LINE-1/TEs, reduciendo así la afinidad de estos sitios por los KZFPs y su potencial represivo sobre los TEs. Esto potencialmente generaría una regulación positiva de las KZFPs para contrarrestar la sobreexpresión de los TEs. Además, *NNMT* también podría afectar la actividad de la proteína *DMBT1* mediante hipometilación, como se ha informado para otros supresores de tumores como *PP2A/PPP2CA* (Ulanovskaya *et al.*, 2013).

Junto con los resultados anteriores, también se ha mostrado que, además de la regulación positiva predominante de LTRs Ty3 causada o afectada por la edad, varios retrotransposones Ty3 y otros retrotransposones no LTR están regulados a la baja por el envejecimiento. Por ejemplo, algunos loci con dominios predichos de retrotransposones no LTR (*LOC790411*: RT de LINE-1 y transposasas; *LOC112547415*: RT de DIRS-1 y ribonucleasas) actúan como *hubs* secundarios de una red de expresión de genes relacionados con el desarrollo muscular que se regula a la baja conjuntamente con el envejecimiento del ajolote. El principal interactador en esta red es *PPP1R3A*, la subunidad reguladora de una forma asociada a glucógeno de la proteína fosfatasa 1 (PP1), la cual media la contracción y síntesis del músculo. Curiosamente, también se identificaron varios C2H2-ZNFs no KRAB (por ejemplo, *ZNF106*) y KZFPs (por ejemplo, *ZNF133*, *ZNF160*, *ZNF182*) subexpresados en la red, lo que sugiere una regulación conjunta de los retrotransposones no LTR y las funciones relacionadas con PP1 por parte de estos factores de transcripción. Además de estos resultados, otros autores han reportado que las KZFPs evolutivamente recientes se dirigen casi universalmente a los TEs, a menudo tienen parálogos, y muestran un interactoma proteico que reprime la transcripción formando un complejo inductor de heterocromatina basado en TRIM28, que coincidentemente es otro interactador de PP1 involucrado en la función muscular (Urrutia, 2003; Helleboid *et al.*, 2019; Tycko *et al.*, 2020; Steinert *et al.*, 2021; de Tribolet-Hardy *et al.*, 2023). En síntesis, el análisis de esta red de expresión sugiere una interacción entre tres proteínas relacionadas con PP1 (*PPP1R3A*, *PPP1R27*, *TRIM28/PPP1R157*), diversos factores de transcripción ZNF (*ZNF106*, *ZNF133*, etc.) y la expresión de varios retrotransposones no LTR.

Con estos datos en mente, es posible proponer que un factor relevante en la supresión del desarrollo y la función del músculo esquelético causado por el envejecimiento en el ajolote es la regulación negativa de la expresión de *PPP1R3A* y, con ella, la limitación de su actividad de unión de glucógeno a PP1. Teniendo en cuenta que en humanos el 95 % de la secuencia promotora de *PPP1R3A* se deriva de secuencias de transposones LTR (Kellner y Makałowski, 2019; Ali *et al.*, 2021), y dado que las KZFPs son capaces de reconocer secuencias embebidas en TEs y facilitar su potencial regulador (de Tribolet-Hardy *et al.*, 2023), podría hipotetizarse que la subexpresión

de varios factores de transcripción KZFP tiene un efecto perjudicial directo sobre la expresión y actividad de PPP1R3A. Es importante destacar que *ZNF106* es un C2H2-ZNF pero no contiene un dominio KRAB, el cual generalmente se requiere para la regulación de la transcripción mediada por TRIM28 (Margolin *et al.*, 1994; Witzgall *et al.*, 1994; Vissing *et al.*, 1995; Taka *et al.*, 2022). Sin embargo, otras KZFPs suprimidas en la misma red (por ejemplo, *ZNF133*, *ZNF160*, *ZNF182*, etc.) podrían tener una afinidad similar por los promotores derivados de TEs de otros genes de desarrollo muscular, o por los otros retrotransposones LINE-1 y DIRS-1 *hub* que se encontraron regulados negativamente en el mismo módulo. En cualquier caso, se necesitan más estudios en el ajolote para establecer el origen y la composición de la secuencia del promotor de *PPP1R3A* y su potencial como sitio de unión de factores de transcripción como los C2H2-ZNFs. Además, se debe determinar si las KZFPs, y ulteriormente cuáles, actúan como activadores o represores de TEs o de secuencias reguladoras en *cis* derivadas de TEs durante la supresión muscular relacionada con el envejecimiento, y si TRIM28, PPP1R3A, PPP1R27 u otras subunidades reguladoras de PP1 dirigen este interactoma proteico.

En general, tanto en el envejecimiento como en la regeneración, se encontró una desregulación significativa de numerosos C2H2-ZNFs y KZFPs junto con retrotransposones LTR y no LTR expresados diferencialmente, formando también redes de coexpresión. Aunque en la mayoría de los casos los cambios en la expresión de TFs y TEs ocurrieron en la misma dirección, hubo casos con regulaciones opuestas, lo que sugiere mecanismos intrincados o factores externos que influyen en los TFs y TEs de forma independiente. En resumen, en este trabajo se propone que las KZFPs y otros C2H2-ZNFs podrían ser importantes reguladores de la expresión de los retrotransposones durante el envejecimiento y la regeneración en el ajolote. Notablemente, Angileri *et al.* (2022) plantearon recientemente la hipótesis de que los TFs, específicamente KRAB-ZFP, tienen un papel significativo en la regulación de la actividad TEs durante la regeneración de tejidos. Aunque ya se ha reportado que la mayoría de las KZFPs reprimen a los TEs en otros organismos, la dirección de su actividad reguladora en este contexto podría depender de la KZFP y TE específicos. Además, la metilación del DNA podría ser uno de los principales mecanismos epigenéticos que dirigen la transcripción de TEs

o genes con promotores/potenciadores derivados de TEs durante el envejecimiento y también durante el desarrollo del blastema. En particular, tanto el DNA como la metilación de histonas pueden influir en la afinidad de los C2H2-ZNFs o KZFPs por sus sitios de unión dentro de los promotores de los TEs u otras secuencias derivadas y de esta manera regular indirectamente su expresión.

7.4. Los efectos del envejecimiento sobre las capacidades regenerativas del ajolote

Previamente se planteó la hipótesis de que los procesos fisiológicos o patológicos como el envejecimiento pueden alterar la expresión de elementos repetitivos y, en consecuencia, modificar el estado basal desde el cual el ajolote responde al daño tisular y regula la regeneración. A favor de esta premisa, aquí se ha mostrado que más retrotransposones y genes codificantes de proteínas están subexpresados en el blastema de ajolotes adultos que en el blastema de ajolotes más jóvenes. Además, ~40 % de los retrotransposones y ~54 % de los genes cuya expresión se detectó regulada positivamente por el envejecimiento en la extremidad, luego se identificaron regulados negativamente en el blastema. Esto significa que, si bien existe una contrarrespuesta significativa durante el desarrollo del tejido regenerativo a la desregulación de genes y REs que resulta del envejecimiento, todavía hay varios genes y REs que permanecen afectados y pueden afectar los procesos regenerativos futuros. El aumento de la expresión de retrotransposones por el envejecimiento podrían modificar la respuesta inmune o el metabolismo, lo que potencialmente conduciría a la disminución de la capacidad regenerativa del ajolote relacionada, no solo mediante la regulación génica directa (por ejemplo, a través de ncRNAs o inserciones genómicas), sino también mediante la producción de intermediarios de retrotransposición. De hecho, los intermediarios de DNA citosólicos producidos por las transcriptasas inversas o incluso las propias transcriptasas podrían desencadenar la actividad del sistema inmunológico (Schneider *et al.*, 2023), inducir la vía del factor nuclear kappa B (NF κ B) o la vía de respuesta inflamatoria del interferón beta (IFN β) (Martin *et al.*, 2018; De Cecco *et al.*, 2019; Simon *et al.*, 2019; Miller *et al.*, 2021), y así conducir a una inflamación crónica y senescencia celular (Miller *et al.*, 2021) que afecta la capacidad de *A. mexicanum* para regenerar una extremidad.

En resumen, en esta tesis se proporciona una colección de genes y elementos repetitivos del ajolote para los cuales se identificó una desregulación significativa como efecto del envejecimiento o durante todo el desarrollo del blastema de la extremidad, y cuyas funciones precisas durante el proceso regenerativo requieren mayor investigación en futuros estudios moleculares.

7.5. Limitaciones de este trabajo

Aunque aquí se ha demostrado que los elementos repetitivos exhiben un patrón claro de regulación positiva predominante como efecto del envejecimiento en el ajolote, estudios transcriptómicos adicionales con especímenes de grupos de edad más precisos (por ejemplo, un grupo por año de edad) podrían proporcionar los medios para definir si la cantidad de transcritos de REs es un buen marcador de la edad biológica en *A. mexicanum* (LaRocca *et al.*, 2020), así como para revelar la dinámica intermedia y los efectos fisiológicos de la expresión de REs a través del envejecimiento.

Por otra parte, aunque los ajolotes estudiados en esta tesis, de un máximo de 8 años de edad en el caso de los nativos, son los ejemplares más longevos secuenciados hasta la fecha, ya se ha reportado que los *A. mexicanum* pueden vivir hasta 20-25 años (Vieira *et al.*, 2020; Yun, 2021), por lo que los resultados presentados aquí podrían no reflejar todos los efectos transcriptómicos del envejecimiento que se esperarían en ejemplares de mayor edad. En otras palabras, sería interesante investigar si los efectos del envejecimiento sobre la expresión de REs y genes codificantes son más pronunciados o exhiben dinámicas distintas en ajolotes de 10, 15 o 20 años de edad.

En el contexto de la regeneración, el análisis de la expresión de REs en blastemas de diversos órganos a intervalos más regulares (cada hora o cada día después de la lesión) podría facilitar la determinación de los mecanismos por los cuales los retrotransposones regulan la expresión génica, el metabolismo o la respuesta inmune en las diferentes etapas de la formación de tejidos. Por otro lado, considerando que la regeneración de un órgano complejo como la extremidad requiere la coordinación de la proliferación y diferenciación de múltiples tipos celulares (Gerber *et al.*, 2018; Lust *et al.*, 2022; Ye *et al.*, 2022), las redes reguladoras centradas en REs también podrían ser específicas de cada célula, por lo que los estudios futuros deberían aprovechar las tecnologías de

secuenciación de una sola célula en los estudios de la expresión de REs en el blastema. Además, la secuenciación de lecturas largas podría mejorar tanto el ensamblaje del transcriptoma de novo, como el mapeo y la cuantificación de la expresión de retrotransposones (Amarasinghe *et al.*, 2020), especialmente en el inmenso genoma del ajolote. Por último, la secuenciación de RNA hebrada (*stranded RNA-seq*) o directa (*direct RNA-seq*) podrían permitir una distinción más precisa de las lecturas que provienen de distintas isoformas de transcritos, de secuencias intragénicas, quiméricas o derivadas de TEs, y de REs que se transcriben en la cadena opuesta de un gen codificante de proteínas (Bertheliet *et al.*, 2023).

Los hallazgos presentados aquí indican que la dinámica y regulación de la expresión de REs en el ajolote puede ser específica no solo de la clase, superfamilia, familia o subfamilia del RE, sino también de la inserción o locus particular del elemento repetitivo. Por lo tanto, la cuantificación de los transcritos de REs en este organismo idealmente debería abordarse a nivel de locus. Sin embargo, las herramientas actuales de cuantificación de REs, como TETranscripts, proporcionan resultados más confiables y reproducibles al estimar abundancias combinadas para todas las inserciones de un elemento, es decir, a nivel de subfamilia (Jin *et al.*, 2015). En este trabajo se intentó generar un índice para las >33 millones de inserciones del repetidoma de ajolote necesario para cuantificar con TElocal, usando el script no paralelizado TElocal_indexer en un servidor con 1 TB de RAM. Sin embargo, este dio como resultado un tiempo de ejecución de más de 123 días antes de su interrupción y terminación, por lo cual el uso de este programa para la cuantificación de REs a nivel de locus en el ajolote no es factible. Esto refleja la necesidad de desarrollar nuevas herramientas de cuantificación de expresión a nivel de locus para repetidomas de decenas de gigabases.

Asimismo, en el presente estudio se integraron muestras de secuenciación de RNA de ajolotes nativos (originarios de Xochimilco) y muestras de varias cepas de laboratorios internacionales. Esto permitió la generalización a nivel de especie pero pasa por alto la importancia del genotipo del ajolote en su fisiología y proceso regenerativo. Por ejemplo, algunos estudios indican que ni el envejecimiento ni las amputaciones repetitivas afectan el potencial regenerativo de los urodelos (Yun, 2021). Se ha reportado que nueve ciclos de regeneración de la cola durante un período de

10 años no afectan el proceso regenerativo en el tritón *Triturus carnifex* (Margotta *et al.*, 2002; Margotta, 2008), y que cinco ciclos de regeneración durante 3 años no afectan la regeneración de la extremidad en el ajolote (Yun *et al.*, 2015). Por el contrario, otros estudios han observado tasas crecientes de regeneraciones incompletas o fallidas después de 3 ciclos regenerativos en el ajolote (D. M. Bryant, Sousounis, Farkas *et al.*, 2017). Aquí se ha documentado que dos ajolotes mexicanos de la cepa Xochimilco de 8 años no regeneraron la extremidad posterior incluso después una única amputación (del Moral-Morales *et al.*, 2023). Esta evidencia fenotípica opuesta en el caso del ajolote puede deberse a la cepa en estudio: el deterioro de la regeneración después de repetidas amputaciones se ha descrito para las cepas americanas, pero no en las cepas europeas (Yun, 2021). Además, la mayoría de las cepas de laboratorio europeas y americanas, y posiblemente la del ensamblaje genómico de referencia actual (Nowoshilow *et al.*, 2018), provienen de una población altamente endogámica que experimentó un evento de hibridación con una salamandra tigre albina, *Ambystoma tigrinum* (Humphrey, 1967; Malacinski, 1978; H. Smith, 1989; Farkas y Monaghan, 2015). De hecho, los análisis de pedigrí de la población de ajolotes del Ambystoma Genetic Stock Center (AGSC) de la Universidad de Kentucky mostraron que todos los individuos de esa población contenían aproximadamente 5.8 (± 1)% de DNA de de la salamandra tigre (Woodcock *et al.*, 2017). Es más, la reproducción prolongada en laboratorio parece haber seleccionado contra la metamorfosis espontánea en cepas de laboratorio (Malacinski, 1978; Voss y Smith, 2005), y la selección contra otros procesos metabólicos o de desarrollo involucrados en la regeneración es plausible. En general, estos informes resaltan la importancia de tener en cuenta la cepa y el genotipo para los análisis de envejecimiento y regeneración en el ajolote (Sámamo *et al.*, 2021), y enfatizan la necesidad de avanzar en los estudios genómicos y transcriptómicos en los ajolotes nativos de Xochimilco.

8. Conclusiones

En este trabajo observamos que los elementos repetitivos, en su mayoría de la superfamilia Ty3, están predominantemente regulados positivamente como efecto del envejecimiento en la extremidad del ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*). Por el contrario, durante la regeneración de la extremidad, la expresión de los retrotransposones Ty3 se regula en gran medida a la baja.

En el contexto de los genes codificantes, identificamos varias vías biológicas enriquecidas, algunas específicas y otras compartidas entre los dos procesos. Por ejemplo, observamos que las vías del desarrollo muscular son suprimidas tanto por el envejecimiento como durante el desarrollo del blastema. Adicionalmente, detectamos genes desregulados con papeles reportados en el desarrollo de la extremidad de otros organismos que, sin embargo, no han sido estudiados en el ajolote, incluyendo a *SHD*, *SHF* y *BHLHA9*, entre otros.

Aunque la mayoría de los retrotransposones expresados diferencialmente no presentan una superposición genómica con los genes expresados diferencialmente en los mismos tejidos, fue posible identificar varios módulos de coexpresión compuestos de tanto genes codificantes como de LTRs y no LTRs, lo que sugiere una red reguladora indirecta mediada por TEs que dirige procesos como la supresión generalizada del desarrollo muscular durante el envejecimiento y la regeneración. Destacamos que aunque el blastema es capaz de reajustar la mayor parte de la desregulación de los transposones causada por el envejecimiento, varios transposones permanecen afectados y tienen potencial para afectar la respuesta inmune o el metabolismo en el proceso regenerativo.

Finalmente, descubrimos varios factores de transcripción C2H2-ZFPs coexpresados con retrotransposones *hub*, por lo que se enfatiza su potencial como los principales reguladores de la expresión de elementos transponibles durante el envejecimiento y la regeneración en el ajolote.

En general, los cambios en la expresión de REs durante la regeneración reparadora en el ajolote no representan una simple explotación de la maquinaria transcripcional del hospedero, sino más bien una respuesta finamente regulada por el estado fisiológico previo y posterior a una lesión, controlada específicamente a nivel del tejido, la célula y el tipo de elementos repetitivo.

9. Perspectivas

Para complementar los resultados de esta tesis en trabajos futuros, se plantea:

- Identificar las dinámicas transcripcionales de los retrotransposones específicas de cada una de las subpoblaciones celulares que participan en la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum* a distintos intervalos horarios posamputación. Este tipo de análisis sería facilitado con el uso de datos de secuenciación de RNA de lectura larga de sola célula (*long-read scRNA-seq*).
- Determinar los blancos genómicos y motivos de unión de los factores de transcripción C2H2-ZNF o KRAB-ZFP en el ajolote, tal como se ha hecho para el humano (de Tribolet-Hardy *et al.*, 2023). Trabajos anteriores han revelado que muchos de estos factores reconocen secuencias localizadas en elementos transponibles y que los facilitan el aprovechamiento su potencial regulador en beneficio del hospedero. Por ello, es importante establecer su relevancia en la regulación de la expresión de retrotransposones a lo largo del envejecimiento y la regeneración en el ajolote.
- Identificar los cambios en la metilación tanto a nivel global como las modificaciones específicas sobre los retrotransposones y secuencias derivadas de REs (promotores, enhancers, etc.) en muestras de extremidad y blastema de ajolotes de distintas edades, y así avanzar en la descripción mecanicista de la regulación de la expresión de los transposones durante la regeneración de la extremidad de *A. mexicanum* y los efectos del envejecimiento.
- Implementar un método de cuantificación a nivel de locus adecuado para el número de inserciones de elementos repetitivos del ajolote, para poder comparar la dinámica de los retrotransposones específica de las coordenadas genómicas.

Referencias

- Agata, K., Saito, Y., y Nakajima, E. (2007). Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Development, Growth & Differentiation*, 49(2), 73-78. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00919.x>
- Ahmad, S., Mu, X., Yang, F., Greenwald, E., Park, J. W., Jacob, E., Zhang, C.-Z., y Hur, S. (2018). Breaching Self-Tolerance to Alu Duplex RNA Underlies MDA5-Mediated Inflammation. *Cell*, 172(4), 797-810.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.016>
- Ali, A., Han, K., y Liang, P. (2021). Role of Transposable Elements in Gene Regulation in the Human Genome. *Life*, 11(2), 118. <https://doi.org/10.3390/life11020118>
- Allanki, S., Strilic, B., Scheinberger, L., Onderwater, Y. L., Marks, A., Günther, S., Preussner, J., Kikhi, K., Looso, M., Stainier, D. Y. R., y Reischauer, S. (2021). Interleukin-11 signaling promotes cellular reprogramming and limits fibrotic scarring during tissue regeneration. *Science Advances*, 7(37), eabg6497. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg6497>
- Amamoto, R., Huerta, V. G. L., Takahashi, E., Dai, G., Grant, A. K., Fu, Z., y Arlotta, P. (2016). Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *eLife*, 5, e13998. <https://doi.org/10.7554/eLife.13998>
- Amarasinghe, S. L., Su, S., Dong, X., Zappia, L., Ritchie, M. E., y Gouil, Q. (2020). Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biology*, 21(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-1935-5>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data* [Babraham Bioinformatics]. Consultado el 1 de junio de 2022, desde <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Angileri, K. M., Bagia, N. A., y Feschotte, C. (2022). Transposon control as a checkpoint for tissue regeneration. *Development*, 149(22), dev191957. <https://doi.org/10.1242/dev.191957>
- Ardeljan, D., Taylor, M. S., Ting, D. T., y Burns, K. H. (2017). The human LINE-1 retrotransposon: an emerging biomarker of neoplasia. *Clinical chemistry*, 63(4), 816-822. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.257444>
- Arkhipova, I. R. (2006). Distribution and phylogeny of Penelope-like elements in eukaryotes. *Systematic Biology*, 55(6), 875-885. <https://doi.org/10.1080/10635150601077683>
- @AxolotlBot. (2020, 4 de noviembre). *Mis ajolotes miran a la eternidad entre la niebla*. [Post en X] [Cuenta automática administrada por Centro Literario Istak Axolotl, Saltillo, Coahuila, México]. Consultado el 5 de noviembre de 2020, desde <https://twitter.com/AxolotlBot/status/1324194778519654400>

- Azpiazu, N., y Morata, G. (2022). Chromatin remodelling and retrotransposons activities during regeneration in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 482, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.11.005>
- Barnada, S. M., Isopi, A., Tejada-Martinez, D., Goubert, C., Patoori, S., Pagliaroli, L., Tracewell, M., y Trizzino, M. (2022). Genomic features underlie the co-option of SVA transposons as cis-regulatory elements in human pluripotent stem cells. *PLoS Genetics*, 18(6), e1010225. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010225>
- Bely, A. E., y Nyberg, K. G. (2010). Evolution of animal regeneration: Re-emergence of a field. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(3), 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.08.005>
- Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. Consultado el 24 de febrero de 2024, desde <https://www.jstor.org/stable/2346101>
- Berthelier, J., Furci, L., Asai, S., Sadykova, M., Shimazaki, T., Shirasu, K., y Saze, H. (2023). Long-read direct RNA sequencing reveals epigenetic regulation of chimeric gene-transposon transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications*, 14(1), 3248. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38954-z>
- Biscotti, M. A., Olmo, E., y Heslop-Harrison, J. S. (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23(3), 415-420. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9499-z>
- Blighe, K., Rana, S., y Lewis, M. (2023). *EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling* (Ver. R package version 1.20.0). <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.EnhancedVolcano>
- Bodó, K., Kellermayer, Z., László, Z., Boros, Á., Kokhanyuk, B., Németh, P., y Engelmann, P. (2021). Injury-induced innate immune response during segment regeneration of the earthworm, *Eisenia andrei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2363. <https://doi.org/10.3390/ijms22052363>
- Bölük, A., Yavuz, M., y Demircan, T. (2022). Axolotl: A resourceful vertebrate model for regeneration and beyond. *Developmental Dynamics*, 251(12), 1914-1933. <https://doi.org/10.1002/dvdy.520>
- Bosch, T. C. G. (2007). Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for *Hydra* regeneration. *Developmental Biology*, 303(2), 421-433. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.012>
- Bourque, G., Burns, K. H., Gehring, M., Gorbunova, V., Seluanov, A., Hammell, M., Imbeault, M., Izsvák, Z., Levin, H. L., Macfarlan, T. S., Mager, D. L., y Feschotte, C. (2018). Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biology*, 19(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1577-z>

- Branco, M. R., y Chuong, E. B. (2020). Crossroads between transposons and gene regulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1795), 20190330. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0330>
- Brunmeir, R., Lagger, S., Simboeck, E., Sawicka, A., Egger, G., Hagelkruys, A., Zhang, Y., Matthias, P., Miller, W. J., y Seiser, C. (2010). Epigenetic Regulation of a Murine Retrotransposon by a Dual Histone Modification Mark. *PLoS Genetics*, 6(4), e1000927. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000927>
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Lee, T. J., Leigh, N. D., Kuo, T.-H., Davis, F. G., Bateman, J., Bryant, S., Guzikowski, A. R., Tsai, S. L., Coyne, S., Ye, W. W., Freeman, R. M., Peshkin, L., Tabin, C. J., ... y Whited, J. L. (2017). A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Reports*, 18(3), 762-776. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.063>
- Bryant, D. M., Sousounis, K., Farkas, J. E., Bryant, S., Thao, N., Guzikowski, A. R., Monaghan, J. R., Levin, M., y Whited, J. L. (2017). Repeated removal of developing limb buds permanently reduces appendage size in the highly-regenerative axolotl. *Developmental Biology*, 424(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.02.013>
- Bryant, D. M., Sousounis, K., Payzin-Dogru, D., Bryant, S., Sandoval, A. G. W., Martinez Fernandez, J., Mariano, R., Oshiro, R., Wong, A. Y., Leigh, N. D., Johnson, K., y Whited, J. L. (2017). Identification of regenerative roadblocks via repeat deployment of limb regeneration in axolotls. *NPJ Regenerative medicine*, 2, 30. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0034-z>
- Bryant, S. V., y Bellairs, A. d. (1967). Tail regeneration in the lizards *anguis fragilis* and *lacerta dugesii*. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, 46(310), 297-305. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1967.tb00510.x>
- Bryant, S. V., French, V., y Bryant, P. J. (1981). Distal Regeneration and Symmetry. *Science*, 212(4498), 993-1002. <https://doi.org/10.1126/science.212.4498.993>
- Buchfink, B., Reuter, K., y Drost, H.-G. (2021). Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods*, 18(4), 366-368. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x>
- Bustos, B. I., Billingsley, K., Blauwendraat, C., Gibbs, J. R., Gan-Or, Z., Krainc, D., Singleton, A. B., Lubbe, S. J., e International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC). (2023). Genome-wide contribution of common short-tandem repeats to Parkinson's disease genetic risk. *Brain: A Journal of Neurology*, 146(1), 65-74. <https://doi.org/10.1093/brain/awac301>
- Caballero-Pérez, J., Espinal-Centeno, A., Falcon, F., García-Ortega, L. F., Curiel-Quesada, E., Cruz-Hernández, A., Bako, L., Chen, X., Martínez, O., Alberto Arteaga-Vázquez, M., Herrera-Estrella, L., y Cruz-Ramírez, A. (2018). Transcriptional landscapes of axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental Biology*, 433(2), 227-239. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.08.022>

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., y Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., y Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38(12), 5825-5829. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>
- Carlson, M. R. J., Komine, Y., Bryant, S. V., y Gardiner, D. M. (2001). Expression of *Hoxb13* and *Hoxc10* in Developing and Regenerating Axolotl Limbs and Tails. *Developmental Biology*, 229(2), 396-406. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0104>
- Carlson, M. (2019a). *org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human* (Ver. 3.8.2). Bioconductor Package Maintainer. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.org.Hs.eg.db>
- Carlson, M. (2019b). *org.Mm.eg.db: Genome wide annotation for Mouse* (Ver. 3.8.2). Bioconductor Package Maintainer. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.org.Mm.eg.db>
- Carlson, M. (2019c). *org.Xl.eg.db: Genome wide annotation for Xenopus* (Ver. 3.8.2). Bioconductor Package Maintainer. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.org.Xl.eg.db>
- Cary, G. A., Wolff, A., Zueva, O., Pattinato, J., e Hinman, V. F. (2019). Analysis of sea star larval regeneration reveals conserved processes of whole-body regeneration across the metazoa. *BMC Biology*, 17(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0633-9>
- Cayuela, H., Olgun, K., Angelini, C., Üzümlü, N., Peyronel, O., Miaud, C., Avcı, A., Lemaitre, J.-F., y Schmidt, B. R. (2019). Slow life-history strategies are associated with negligible actuarial senescence in western Palearctic salamanders. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1909), 20191498. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1498>
- Cedar, H., y Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews. Genetics*, 10(5), 295-304. <https://doi.org/10.1038/nrg2540>
- Chen, C.-F., Sung, T.-L., Chen, L.-Y., y Chen, J.-H. (2018). Telomere maintenance during anterior regeneration and aging in the freshwater annelid *Aelosoma viride*. *Scientific Reports*, 8(1), 18078. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36396-y>
- Chen, H., Zheng, X., Xiao, D., y Zheng, Y. (2016). Age-associated de-repression of retrotransposons in the drosophila fat body, its potential cause and consequence. *Aging Cell*, 15(3), 542-552. <https://doi.org/10.1111/acel.12465>
- Chen, J.-M., Cooper, D. N., Férec, C., Kehrer-Sawatzki, H., y Patrinos, G. P. (2010). Genomic rearrangements in inherited disease and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 20(4), 222-233. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.05.007>

- Chen, X., Zhang, B., Wang, T., Bonni, A., y Zhao, G. (2020). Robust principal component analysis for accurate outlier sample detection in RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, 21(1), 269. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03608-0>
- Chin, C.-H., Chen, S.-H., Wu, H.-H., Ho, C.-W., Ko, M.-T., y Lin, C.-Y. (2014). cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, 8(4), S11. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11>
- Chinwalla, A. T., Cook, L. L., Delehaunty, K. D., Fewell, G. A., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Graves, T. A., Hillier, L. W., Mardis, E. R., McPherson, J. D., Miner, T. L., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Pepin, K. H., Pohl, C. S., Ponce, T. C., Schultz, B., Thompson, J., ... y Members of the Mouse Genome Analysis Group. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520-562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Chuong, E. B., Elde, N. C., y Feschotte, C. (2016). Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science*, 351(6277), 1083-1087. <https://doi.org/10.1126/science.aad5497>
- Cloutier, J. K., McMann, C. L., Oderberg, I. M., y Reddien, P. W. (2021). Activin-2 is required for regeneration of polarity on the planarian anterior-posterior axis. *PLOS Genetics*, 17(3), e1009466. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009466>
- Comish, P. B., Carlson, D., Kang, R., y Tang, D. (2020). Damage-Associated Molecular Patterns and the Systemic Immune Consequences of Severe Thermal Injury. *The Journal of Immunology*, 205(5), 1189-1197. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000439>
- Contreras, V., Martínez-Meyer, E., Valiente, E., y 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>
- Cowley, M., y Oakey, R. J. (2013). Transposable elements re-wire and fine-tune the transcriptome. *PLOS Genetics*, 9(1), e1003234. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003234>
- Crichton, J. H., Dunican, D. S., MacLennan, M., Meehan, R. R., y Adams, I. R. (2014). Defending the genome from the enemy within: mechanisms of retrotransposon suppression in the mouse germline. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(9), 1581-1605. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1468-0>
- Da Silva-Álvarez, S., Guerra-Varela, J., Sobrido-Cameán, D., Quelle, A., Barreiro-Iglesias, A., Sánchez, L., y Collado, M. (2020). Cell senescence contributes to tissue regeneration in zebrafish. *Aging Cell*, 19(1), e13052. <https://doi.org/10.1111/acel.13052>

- Davaapil, H., Brockes, J. P., y Yun, M. H. (2017). Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development*, *144*(1), 106-114. <https://doi.org/10.1242/dev.138222>
- De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., Skvir, N. J., Criscione, S. W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E. M., Boeke, J. D., Le, O., Beauséjour, C., Ambati, J., Ambati, K., Simon, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., Slagboom, P. E., Helfand, S. L., ... y Sedivy, J. M. (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*, *566*(7742), 73-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>
- del Moral-Morales, A., Sámano, C., Ocampo-Cervantes, J. A., Topf, M., Baumbach, J., González-Barrios, R., y Soto-Reyes, E. (2023). Key proteins for regeneration in *A. mexicanum*: Transcriptomic insights from aged and juvenile limbs. *bioRxiv*, 2023.09.07.556684. <https://doi.org/10.1101/2023.09.07.556684v1>
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., de Bruin, A., Hara, E., y Campisi, J. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, *31*(6), 722-733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Demircan, T., Hacibektaşoğlu, H., Sibai, M., Feşcioğlu, E. C., Altuntaş, E., Öztürk, G., y Süzek, B. E. (2020). Preclinical Molecular Signatures of Spinal Cord Functional Restoration: Optimizing the Metamorphic Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) Model in Regenerative Medicine. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, *24*(6), 370-378. <https://doi.org/10.1089/omi.2020.0024>
- de Sahagún, B. (1577a). Libro séptimo, que trata de la astrología y filosofía natural que alcanzaron estos naturales de esta Nueva España. Capítulo segundo, de la Luna. Folio 6. En *Historia general de las cosas de Nueva España: El Códice Florentino* (Páginas en la versión digitalizada [PDF]: 469-470, Vols. 3, Vol. 2). Consultado el 27 de febrero de 2022, desde <https://lccn.loc.gov/2021667837>
- de Sahagún, B. (1577b). Libro undécimo, de las propiedades de los animales, aves, peces, árboles, hierbas, flores, metales y piedras, y de los colores. Capítulo tercero, de los animales del agua. Párrafo quinto, de los renacuajos y otras savandijas del agua que comen estos naturales. Folio 68. En *Historia general de las cosas de Nueva España: El Códice Florentino* (Página en la versión digitalizada [PDF]: 451, Vols. 3, Vol. 3). Consultado el 27 de febrero de 2022, desde <https://lccn.loc.gov/2021667837>
- de Tribolet-Hardy, J., Thorball, C. W., Forey, R., Planet, E., Duc, J., Coudray, A., Khubieh, B., Offner, S., Pulver, C., Fellay, J., Imbeault, M., Turelli, P., y Trono, D. (2023). Genetic features and

- genomic targets of human KRAB-zinc finger proteins. *Genome Research*, 33(8), 1409-1423. <https://doi.org/10.1101/gr.277722.123>
- DGCS UNAM. (2022). Al rescate del ajolote de Xochimilco con la campaña internacional “Adoptaxolotl”. *Boletín UNAM-DGCS-972*. Consultado el 13 de febrero de 2024, desde https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2022_972.html
- Divulgación de la Ciencia UAM-X. (2021, 29 de marzo). *La colonia de Ajolotes del CIBAC-UAMX*. Dr. José Antonio Ocampo. *Gente de ciencia*. Divulgación de la Ciencia, Coordinación de Extensión Universitaria, Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco. Consultado el 22 de enero de 2023, desde <https://youtu.be/02mGjsjN5Ts?si=7C-6y-jUtXSg4Qh5>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., y Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dombroski, B. A., Feng, Q., Mathias, S. L., Sassaman, D. M., Scott, A. F., Kazazian Jr., H. H., y Boeke, J. D. (1994). An In Vivo Assay for the Reverse Transcriptase of Human Retrotransposon L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 14(7), 4485-4492. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.7.4485-4492.1994>
- Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J., y Jensen, L. J. (2019). Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 623-632. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00702>
- Dwaraka, V. B., Smith, J. J., Woodcock, M. R., y Voss, S. R. (2019). Comparative transcriptomics of limb regeneration: Identification of conserved expression changes among three species of *Ambystoma*. *Genomics*, 111(6), 1216-1225. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.07.017>
- Elchaninov, A., Sukhikh, G., y Fatkhudinov, T. (2021). Evolution of Regeneration in Animals: A Tangled Story. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9(621686). <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.621686>
- Elewa, A., Wang, H., Talavera-López, C., Joven, A., Brito, G., Kumar, A., Hameed, L. S., Penrad-Mobayed, M., Yao, Z., Zamani, N., Abbas, Y., Abdullayev, I., Sandberg, R., Grabherr, M., Andersson, B., y Simon, A. (2017). Reading and editing the pleurodeles waltl genome reveals novel features of tetrapod regeneration. *Nature Communications*, 8(1), 2286. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01964-9>
- Eming, S. A., Wynn, T. A., y Martin, P. (2017). Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*, 356(6342), 1026-1030. <https://doi.org/10.1126/science.aam7928>
- Endo, T., Bryant, S. V., y Gardiner, D. M. (2004). A stepwise model system for limb regeneration. *Developmental Biology*, 270(1), 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.016>

- Espinal-Centeno, A., Dipp-Álvarez, M., Saldaña, C., Bako, L., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103651>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., y Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Farkas, J. E., y Monaghan, J. R. (2015). Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1290, 27-46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2495-0_3
- Faulkner, G. J., y Carninci, P. (2009). Altruistic functions for selfish DNA. *Cell Cycle*, 8(18), 2895-2900. <https://doi.org/10.4161/cc.8.18.9536>
- Fei, J.-F., Schuez, M., Knapp, D., Taniguchi, Y., Drechsel, D. N., y Tanaka, E. M. (2017). Efficient gene knockin in axolotl and its use to test the role of satellite cells in limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(47), 12501-12506. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706855114>
- Fei, J.-F., Schuez, M., Tazaki, A., Taniguchi, Y., Roensch, K., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.06.018>
- Femenias, M. M., Santos, J. C., Sites, J. W., Jr, Avila, L. J., y Morando, M. (2022). ExplorATE: a new pipeline to explore active transposable elements from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 38(13), 3361-3366. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac354>
- Ferrario, C., Ben Khadra, Y., Czarkwiani, A., Zakrzewski, A., Martinez, P., Colombo, G., Bonasoro, F., Candia Carnevali, M. D., Oliveri, P., y Sugni, M. (2018). Fundamental aspects of arm repair phase in two echinoderm models. *Developmental Biology*, 433(2), 297-309. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.035>
- Ferretti, P., y Brockes, J. P. (1988). Culture of newt cells from different tissues and their expression of a regeneration-associated antigen. *Journal of Experimental Zoology*, 247(1), 77-91. <https://doi.org/10.1002/jez.1402470111>
- Ferris, D. R., Satoh, A., Mandefro, B., Cummings, G. M., Gardiner, D. M., y Rugg, E. L. (2010). Ex vivo generation of a functional and regenerative wound epithelium from axolotl (*Ambystoma mexicanum*) skin. *Development, Growth & Differentiation*, 52(8), 715-724. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01208.x>
- Feschotte, C. (2008). Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature Reviews. Genetics*, 9(5), 397-405. <https://doi.org/10.1038/nrg2337>

- Finch, C. E. (1994, mayo). *Longevity, senescence, and the genome*. University of Chicago Press. Consultado el 15 de febrero de 2023, desde <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/L/bo3684707.html>
- Finnegan, D. J. (2012). Retrotransposons. *Current biology: CB*, 22(11), R432-437. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.025>
- Freitas, P. D., Lovely, A. M., y Monaghan, J. R. (2019). Investigating nrg1 signaling in the regenerating axolotl spinal cord using multiplexed FISH. *Developmental Neurobiology*, 79(5), 453-467. <https://doi.org/10.1002/dneu.22670>
- French, V., Bryant, P. J., y Bryant, S. V. (1976). Pattern Regulation in Epimorphic Fields. *Science*, 193(4257), 969-981. <https://doi.org/10.1126/science.948762>
- Frías-Alvarez, P., Zúñiga-Vega, J. J., y Flores-Villela, O. (2010). A general assessment of the conservation status and decline trends of mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation*, 19(13), 3699-3742. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9923-9>
- Frost, D. R. (2020). Amphibian species of the world: An online reference [Institution: American Museum of Natural History]. <https://doi.org/doi.org/10.5531/db.vz.0001>
- Fueyo, R., Judd, J., Feschotte, C., y Wysocka, J. (2022). Roles of transposable elements in the regulation of mammalian transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00457-y>
- Gallinari, P., Marco, S. D., Jones, P., Pallaoro, M., y Steinkühler, C. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: From molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research*, 17(3), 195-211. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310149>
- Ganten, D., Ruckpaul, K., Birchmeier, W., Epplen, J. T., Genser, K., Manfred Gossen, Kersten, B., Lehrach, H., Oschkinat, H., Ruiz, P., Schmieder, P., Wanker, E., y Nolte, C. (Eds.). (2006, 30 de junio). *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* (1.ª ed.). Springer Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9>
- Gázquez-Gutiérrez, A., Witteveldt, J., Heras, S. R., y Macias, S. (2021). Sensing of transposable elements by the antiviral innate immune system. *RNA*, 27(7), 735-752. <https://doi.org/10.1261/rna.078721.121>
- Gebrie, A. (2023). Transposable elements as essential elements in the control of gene expression. *Mobile DNA*, 14(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13100-023-00297-3>
- Genovese, L. M., Geraci, F., Corrado, L., Mangano, E., D'Aurizio, R., Bordoni, R., Severgnini, M., Manzini, G., De Bellis, G., D'Alfonso, S., y Pellegrini, M. (2018). A Census of Tandemly Repeated Polymorphic Loci in Genic Regions Through the Comparative Integration of Human Genome Assemblies. *Frontiers in Genetics*, 9, 155. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00155>
- Gerber, T., Murawala, P., Knapp, D., Masselink, W., Schuez, M., Hermann, S., Gac-Santel, M., Nowoshilow, S., Kageyama, J., Khattak, S., Currie, J. D., Camp, J. G., Tanaka, E. M.,

- y Treutlein, B. (2018). Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. *Science*, 362(6413), eaaq0681. <https://doi.org/10.1126/science.aaq0681>
- Ghosh, S., Roy, S., Séguin, C., Bryant, S. V., y Gardiner, D. M. (2008). Analysis of the expression and function of wnt-5a and wnt-5b in developing and regenerating axolotl (*Ambystoma mexicanum*) limbs. *Development, Growth & Differentiation*, 50(4), 289-297. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01000.x>
- Gilbert, E. a. B., Delorme, S. L., y Vickaryous, M. K. (2015). The regeneration blastema of lizards: an amniote model for the study of appendage replacement. *Regeneration*, 2(2), 45-53. <https://doi.org/10.1002/reg2.31>
- Gilbert, E. A. B., Payne, S. L., y Vickaryous, M. K. (2013). The Anatomy and Histology of Caudal Autotomy and Regeneration in Lizards. *Physiological and Biochemical Zoology*, 86(6), 631-644. <https://doi.org/10.1086/673889>
- Gladyshev, E. A., y Arkhipova, I. R. (2007). Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9352-9357. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702741104>
- Gonzalez-Hernandez, M. J., Swanson, M. D., Contreras-Galindo, R., Cookinham, S., King, S. R., Noel, R. J., Kaplan, M. H., y Markovitz, D. M. (2012). Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K (HML-2) Is Activated by the Tat Protein of HIV-1. *Journal of Virology*, 86(15), 7790-7805. <https://doi.org/10.1128/jvi.07215-11>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., ... y Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Gu, Z., Eils, R., y Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847-2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Guerin, D. J., Kha, C. X., y Tseng, K. A.-S. (2021). From Cell Death to Regeneration: Rebuilding After Injury. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.655048>
- Guimond, J.-C., Lévesque, M., Michaud, P.-L., Berdugo, J., Finnson, K., Philip, A., y Roy, S. (2010). BMP-2 functions independently of SHH signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs. *BMC Developmental Biology*, 10(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-15>

- Guo, C., Jeong, H.-H., Hsieh, Y.-C., Klein, H.-U., Bennett, D. A., De Jager, P. L., Liu, Z., y Shulman, J. M. (2018). Tau Activates Transposable Elements in Alzheimer's Disease. *Cell Reports*, 23(10), 2874-2880. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.004>
- Hale, B. G. (2022). Antiviral immunity triggered by infection-induced host transposable elements. *Current Opinion in Virology*, 52, 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.12.006>
- Han, G., Zhang, N., Jiang, H., Meng, X., Qian, K., Zheng, Y., Xu, J., y Wang, J. (2021). Diversity of short interspersed nuclear elements (SINEs) in lepidopteran insects and evidence of horizontal SINE transfer between baculovirus and lepidopteran hosts. *BMC Genomics*, 22(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07543-z>
- Han, M.-J., An, J.-Y., y Kim, W.-S. (2001). Expression patterns of fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl. *Developmental Dynamics*, 220(1), 40-48. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-DVDY1085>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1085>3.0.CO;2-8)
- Han, Y., y Wessler, S. R. (2010). MITE-Hunter: a program for discovering miniature inverted-repeat transposable elements from genomic sequences. *Nucleic Acids Research*, 38(22), e199. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq862>
- Harshbarger, J. C., Chang, S. C., DeLanney, L. E., Rose, F. L., y Green, D. E. (1999). Cutaneous mastocytomas in the neotenic caudate amphibians *ambystoma mexicanum* (axolotl) and *ambystoma tigrinum* (tiger salamander). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 125(3), 187-192. <https://doi.org/10.1007/s004320050262>
- Helleboid, P.-Y., Heusel, M., Duc, J., Piot, C., Thorball, C. W., Coluccio, A., Pontis, J., Imbeault, M., Turelli, P., Aebersold, R., y Trono, D. (2019). The interactome of KRAB zinc finger proteins reveals the evolutionary history of their functional diversification. *The EMBO Journal*, 38(18), e101220. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101220>
- Hendrich, B., y Bird, A. (1998). Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6538-6547. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6538>
- HMMER 3.3.2. (2020, 26 de noviembre). Consultado el 4 de octubre de 2023, desde <http://hmmer.org/>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., y Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47, D309-D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Humphrey, R. R. (1967). Albino Axolotls from an Albino Tiger Salamander through Hybridization. *Journal of Heredity*, 58(3), 95-101. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107572>

- Ignatiadis, N., Klaus, B., Zaugg, J. B., y Huber, W. (2016). Data-driven hypothesis weighting increases detection power in genome-scale multiple testing. *Nature Methods*, *13*(7), 577-580. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3885>
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2019). *Ambystoma mexicanum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T1095A53947343. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T1095A53947343.en>
- Jaganjac, M., Milkovic, L., Zarkovic, N., y Zarkovic, K. (2022). Oxidative stress and regeneration. *Free Radical Biology & Medicine*, *181*, 154-165. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.004>
- Jin, Y., Tam, O. H., Paniagua, E., y Hammell, M. (2015). TETranscripts: a package for including transposable elements in differential expression analysis of RNA-seq datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *31*(22), 3593-3599. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv422>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., 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.-Y., Lopez, R., y Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, *30*(9), 1236-1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Jun, J.-I., y Lau, L. F. (2010). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging*, *2*(9), 627-631. <https://doi.org/10.18632/aging.100201>
- Jurka, J., Kapitonov, V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., y Walichiewicz, J. (2005). Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research*, *110*(1), 462-467. <https://doi.org/10.1159/000084979>
- Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kohany, O., y Jurka, M. V. (2007). Repetitive Sequences in Complex Genomes: Structure and Evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *8*(1), 241-259. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.8.080706.092416>
- Kapitonov, V. V., y Jurka, J. (2001). Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(15), 8714-8719. <https://doi.org/10.1073/pnas.151269298>
- Kapitonov, V. V., y Jurka, J. (2007). Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends in Genetics*, *23*(10), 521-529. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.08.004>
- Karolchik, D., Hinrichs, A. S., Furey, T. S., Roskin, K. M., Sugnet, C. W., Haussler, D., y Kent, W. J. (2004). The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Research*, *32*, D493-D496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh103>
- Karttunen, K., Patel, D., Xia, J., Fei, L., Palin, K., Aaltonen, L., y Sahu, B. (2023). Transposable elements as tissue-specific enhancers in cancers of endodermal lineage. *Nature Communications*, *14*(1), 5313. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41081-4>

- Kataoka, K., Matsushima, T., Ito, Y., Sato, T., Yokoyama, S., y Asahara, H. (2018). Bhlha9 regulates apical ectodermal ridge formation during limb development. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 36(1), 64-72. <https://doi.org/10.1007/s00774-017-0820-0>
- Kawakami, Y., Esteban, C. R., Raya, M., Kawakami, H., Martí, M., Dubova, I., y Belmonte, J. C. I. (2006). Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes & Development*, 20(23), 3232-3237. <https://doi.org/10.1101/gad.1475106>
- Kellner, M., y Makałowski, W. (2019). Transposable elements significantly contributed to the core promoters in the human genome. *Science China Life Sciences*, 62(4), 489-497. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9449-0>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., y Haussler, R. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Research*, 12(6), 996-1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
- Khan, S. A. (2000). Plasmid rolling-circle replication: Recent developments. *Molecular Microbiology*, 37(3), 477-484. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02001.x>
- Khudoley, V. V., y Mizgireuv, I. V. (1980). On spontaneous skin tumours in amphibia. *Neoplasma*, 27(3), 289-293.
- Kim, W.-S., y Stocum, D. L. (1986a). Effects of retinoids on regenerating limbs: Comparison of retinoic acid and arotinoid at different amputation levels. *Roux's archives of developmental biology*, 195(7), 455-463. <https://doi.org/10.1007/BF00375749>
- Kim, W.-S., y Stocum, D. L. (1986b). Retinoic acid modifies positional memory in the anteroposterior axis of regenerating axolotl limbs. *Developmental Biology*, 114(1), 170-179. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90393-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90393-3)
- Kojima, K. K. (2018). Human transposable elements in Repbase: genomic footprints from fish to humans. *Mobile DNA*, 9, 2. <https://doi.org/10.1186/s13100-017-0107-y>
- Kojima, K. K. (2020). Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements. *Genes & Genetic Systems*, 94(6), 233-252. <https://doi.org/10.1266/ggs.18-00024>
- Kojima, K. K., y Jurka, J. (2011). Crypton transposons: identification of new diverse families and ancient domestication events. *Mobile DNA*, 2, 12. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-2-12>
- Kondili, M., Fust, A., Preussner, J., Kuenne, C., Braun, T., y Looso, M. (2017). UROPA: A tool for universal ROburst peak annotation. *Scientific Reports*, 7(1), 2593. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02464-y>
- Korotkevich, G., Sukhov, V., Budin, N., Shpak, B., Artyomov, M. N., y Sergushichev, A. (2021, 1 de febrero). Fast gene set enrichment analysis. <https://doi.org/10.1101/060012>
- Kramerov, D. A., y Vassetzky, N. S. (2011). Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes. *Heredity*, 107(6), 487-495. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.43>

- Kreiling, J. A., Jones, B. C., Wood, J. G., De Cecco, M., Criscione, S. W., Neretti, N., Helfand, S. L., y Sedivy, J. M. (2017). Contribution of retrotransposable elements to aging. En G. Cristofari (Ed.), *Human retrotransposons in health and disease* (pp. 297-321). Springer International Publishing. Consultado el 29 de enero de 2023, desde https://doi.org/10.1007/978-3-319-48344-3_13
- Krupovic, M., y Koonin, E. V. (2015). Polintons: a hotbed of eukaryotic virus, transposon and plasmid evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, *13*(2), 105-115. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3389>
- Kuo, T.-H., Kowalko, J. E., DiTommaso, T., Nyambi, M., Montoro, D. T., Essner, J. J., y Whitted, J. L. (2015). TALEN-mediated gene editing of the thrombospondin-1 locus in axolotl. *Regeneration*, *2*(1), 37-43. <https://doi.org/10.1002/reg2.29>
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., ... y The Wellcome Trust: (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Langfelder, P., y Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- LaRocca, T. J., Cavalier, A. N., y Wahl, D. (2020). Repetitive elements as a transcriptomic marker of aging: Evidence in multiple datasets and models. *Aging Cell*, *19*(7), e13167. <https://doi.org/10.1111/accel.13167>
- LaRocca, T. J., Mariani, A., Watkins, L. R., y Link, C. D. (2019). TDP-43 knockdown causes innate immune activation via protein kinase R in astrocytes. *Neurobiology of Disease*, *132*, 104514. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104514>
- Leach, L. L., Hanovice, N. J., George, S. M., Gabriel, A. E., y Gross, J. M. (2021). The immune response is a critical regulator of zebrafish retinal pigment epithelium regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(21), e2017198118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017198118>
- Lee, H., Min, J. W., Mun, S., y Han, K. (2022). Human retrotransposons and effective computational detection methods for next-generation sequencing data. *Life*, *12*(10), 1583. <https://doi.org/10.3390/life12101583>
- Lee, H.-E., Park, S.-J., Huh, J.-W., Imai, H., y Kim, H.-S. (2021). The enhancer activity of long interspersed nuclear element derived microRNA 625 induced by NF- κ B. *Scientific Reports*, *11*, 3139. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82735-x>
- Lee, H.-K., Park, S.-J., Oh, H.-J., Kim, J.-W., Bae, H.-S., y Park, J.-C. (2012). Expression pattern, subcellular localization, and functional implications of ODAM in ameloblasts, odontoblasts,

- osteoblasts, and various cancer cells. *Gene Expression Patterns*, 12(3), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2012.02.002>
- Lee, T.-f., Gurazada, S. G. R., Zhai, J., Li, S., Simon, S. A., Matzke, M. A., Chen, X., y Meyers, B. C. (2012). RNA polymerase V-dependent small RNAs in Arabidopsis originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics*, 7(7), 781-795. <https://doi.org/10.4161/epi.20290>
- Leek, J. T., Johnson, W. E., Parker, H. S., Jaffe, A. E., y Storey, J. D. (2012). The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*, 28(6), 882-883. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts034>
- Lefkopoulos, S., Polyzou, A., Derecka, M., Bergo, V., Clapes, T., Cauchy, P., Jerez-Longres, C., Onishi-Seebacher, M., Yin, N., Martagon-Calderón, N.-A., Potts, K. S., Klaeylé, L., Liu, F., Bowman, T. V., Jenuwein, T., Mione, M. C., y Trompouki, E. (2020). Repetitive Elements Trigger RIG-I-like Receptor Signaling that Regulates the Emergence of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Immunity*, 53(5), 934-951.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.007>
- Leigh, N. D., Dunlap, G. S., Johnson, K., Mariano, R., Oshiro, R., Wong, A. Y., Bryant, D. M., Miller, B. M., Ratner, A., Chen, A., Ye, W. W., Haas, B. J., y Whited, J. L. (2018). Transcriptomic landscape of the blastema niche in regenerating adult axolotl limbs at single-cell resolution. *Nature Communications*, 9(1), 5153. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07604-0>
- Lévesque, M., Gatién, S., Finnson, K., Desmeules, S., Villiard, É., Pilote, M., Philip, A., y Roy, S. (2007). Transforming growth factor: B signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PLOS ONE*, 2(11), e1227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001227>
- Lévesque, M., Villiard, É., y Roy, S. (2010). Skin wound healing in axolotls: A scarless process. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314B(8), 684-697. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21371>
- Levin, H. L., y Moran, J. V. (2011). Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews Genetics*, 12(9), 615-627. <https://doi.org/10.1038/nrg3030>
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., y Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, 69(6), 905-914. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90610-o](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90610-o)
- Li, D., Zand, M. S., Dye, T. D., Goniewicz, M. L., Rahman, I., y Xie, Z. (2022). An evaluation of RNA-seq differential analysis methods. *PLOS ONE*, 17(9), e0264246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264246>
- Li, W., Jin, Y., Prazak, L., Hammell, M., y Dubnau, J. (2012). Transposable elements in TDP-43-mediated neurodegenerative disorders. *PLOS ONE*, 7(9), e44099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044099>

- Liao, X., Zhu, W., Zhou, J., Li, H., Xu, X., Zhang, B., y Gao, X. (2023). Repetitive DNA sequence detection and its role in the human genome. *Communications Biology*, 6(1), 1-21. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05322-y>
- Lindholm, C. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E., y Welsh, M. (2000). Shf, a Shb-like adapter protein, is involved in PDGF-alpha-receptor regulation of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(3), 537-543. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3847>
- Liu, Y.-N., Chen, R.-M., Pu, Q.-T., Nneji, L. M., y Sun, Y.-B. (2022). Expression Plasticity of Transposable Elements Is Highly Associated with Organismal Re-adaptation to Ancestral Environments. *Genome Biology and Evolution*, 14(6), evac084. <https://doi.org/10.1093/gbe/evac084>
- Londono, R., Sun, A. X., Tuan, R. S., y Lozito, T. P. (2018). Tissue repair and epimorphic regeneration: An overview. *Current Pathobiology Reports*, 6(1), 61-69. <https://doi.org/10.1007/s40139-018-0161-2>
- López-Maury, L., Marguerat, S., y Bähler, J. (2008). Tuning gene expression to changing environments: From rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 583-593. <https://doi.org/10.1038/nrg2398>
- Love, M. I., Huber, W., y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ludolph, D. C., Cameron, J. A., y Stocum, D. L. (1990). The effect of retinoic acid on positional memory in the dorsoventral axis of regenerating axolotl limbs. *Developmental Biology*, 140(1), 41-52. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90051-J](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90051-J)
- Lust, K., Maynard, A., Gomes, T., Fleck, J. S., Camp, J. G., Tanaka, E. M., y Treutlein, B. (2022). Single-cell analyses of axolotl telencephalon organization, neurogenesis, and regeneration. *Science*, 377(6610), eabp9262. <https://doi.org/10.1126/science.abp9262>
- Macfarlan, T. S., Gifford, W. D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H. M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O., Trono, D., y Pfaff, S. L. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*, 487(7405), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nature11244>
- Mahapatra, C., Naik, P., Swain, S. K., y Mohapatra, P. P. (2023). Unravelling the limb regeneration mechanisms of Polypedates maculatus, a sub-tropical frog, by transcriptomics. *BMC Genomics*, 24, 122. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09205-8>
- Mahmood, R., Bresnick, J., Hornbruch, A., Mahony, C., Morton, N., Colquhoun, K., Martin, P., Lumsden, A., Dickson, C., y Mason, I. (1995). A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Current Biology*, 5(7), 797-806. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(95\)00157-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00157-6)

- Makanae, A., Hirata, A., Honjo, Y., Mitogawa, K., y Satoh, A. (2013). Nerve independent limb induction in axolotls. *Developmental Biology*, 381(1), 213-226. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.05.010>
- Makanae, A., Mitogawa, K., y Satoh, A. (2014). Co-operative Bmp- and Fgf-signaling inputs convert skin wound healing to limb formation in urodele amphibians. *Developmental Biology*, 396(1), 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.021>
- Makanae, A., y Satoh, A. (2012). Early regulation of axolotl limb regeneration. *The Anatomical Record*, 295(10), 1566-1574. <https://doi.org/10.1002/ar.22529>
- Makanae, A., Tajika, Y., Nishimura, K., Saito, N., Tanaka, J.-i., y Satoh, A. (2020). Neural regulation in tooth regeneration of ambystoma mexicanum. *Scientific Reports*, 10(1), 9323. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66142-2>
- Malacinski, G. M. (1978). The Mexican Axolotl, *Ambystoma mexicanum*: Its Biology and Developmental Genetics, and Its Autonomous Cell-lethal Genes. *American Zoologist*, 18(2), 195-206. <https://doi.org/10.1093/icb/18.2.195>
- Malicki, M., Spaller, T., Winckler, T., y Hammann, C. (2020). DIRS retrotransposons amplify via linear, single-stranded cDNA intermediates. *Nucleic Acids Research*, 48(8), 4230-4243. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa160>
- Manghera, M., Ferguson-Parry, J., Lin, R., y Douville, R. N. (2016). NF- κ B and IRF1 Induce Endogenous Retrovirus K Expression via Interferon-Stimulated Response Elements in Its 5' Long Terminal Repeat. *Journal of Virology*, 90(20), 9338-9349. <https://doi.org/10.1128/jvi.01503-16>
- Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W. K., Vissing, H., Thiesen, H. J., y Rauscher, F. J. (1994). Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4509-4513. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4509>
- Margotta, V. (2008). Further amputations of the tail in adult *Triturus carnifex*: contribution to the study on the nature of regenerated spinal cord. *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia*, 113(3), 167-186.
- Margotta, V., Filoni, S., Merante, A., y Chimenti, C. (2002). Analysis of morphogenetic potential of caudal spinal cord in *Triturus carnifex* adults (Urodele amphibians) subjected to repeated tail amputations. *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia*, 107(2), 127-144.
- Martin, M., Hiroyasu, A., Guzman, R. M., Roberts, S. A., y Goodman, A. G. (2018). Analysis of *Drosophila* STING Reveals an Evolutionarily Conserved Antimicrobial Function. *Cell Reports*, 23(12), 3537-3550.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.029>

- Mashanov, V. S., Zueva, O. R., y García-Arrarás, J. E. (2012a). Posttraumatic regeneration involves differential expression of long terminal repeat (LTR) retrotransposons. *Developmental Dynamics*, 241(10), 1625-1636. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23844>
- Mashanov, V. S., Zueva, O. R., y García-Arrarás, J. E. (2012b). Retrotransposons in animal regeneration. *Mobile Genetic Elements*, 2(5), 244-247. <https://doi.org/10.4161/mge.22644>
- McCusker, C., Bryant, S. V., y Gardiner, D. M. (2015). The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration*, 2(2), 54-71. <https://doi.org/10.1002/reg2.32>
- McNulty, S. M., y Sullivan, B. A. (2018). Alpha satellite DNA biology: Finding function in the recesses of the genome. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 26(3), 115-138. <https://doi.org/10.1007/s10577-018-9582-3>
- Meehan, R. R., Lewis, J. D., y Bird, A. P. (1992). Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Research*, 20(19), 5085-5092. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5085>
- Mendiola, M. V., Bernales, I., y de la Cruz, F. (1994). Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(5), 1922-1926. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1922>
- Mescher, A. L., White, G. W., y Brokaw, J. J. (2000). Apoptosis in regenerating and denervated, nonregenerating urodele forelimbs. *Wound Repair and Regeneration*, 8(2), 110-116. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2000.00110.x>
- Mikkelsen, T. S., Wakefield, M. J., Aken, B., Amemiya, C. T., Chang, J. L., Duke, S., Garber, M., Gentles, A. J., Goodstadt, L., Heger, A., Jurka, J., Kamal, M., Mauceli, E., Searle, S. M. J., Sharpe, T., Baker, M. L., Batzer, M. A., Benos, P. V., Belov, K., ... y Lindblad-Toh, K. (2007). Genome of the marsupial monodelphis domestica reveals innovation in non-coding sequences. *Nature*, 447(7141), 167-177. <https://doi.org/10.1038/nature05805>
- Miller, K. N., Victorelli, S. G., Salmonowicz, H., Dasgupta, N., Liu, T., Passos, J. F., y Adams, P. D. (2021). Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease. *Cell*, 184(22), 5506-5526. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.034>
- Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., y Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 398(6729), 708-713. <https://doi.org/10.1038/19531>
- Min, S., y Whited, J. L. (2023). Limb blastema formation: How much do we know at a genetic and epigenetic level? *Journal of Biological Chemistry*, 299(2). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102858>

- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., y Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*, D412-D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Modesto, F., Nicolier, A., Hurtrel, C., y Benoît, J. (2022). Excisional biopsy and radiotherapy for management of an olfactory neuroblastoma in an axolotl (*ambystoma mexicanum*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *260*(4), 436-441. <https://doi.org/10.2460/javma.20.09.0498>
- Mollenhauer, J., Wiemann, S., Scheurlen, W., Korn, B., Hayashi, Y., Wilgenbus, K. K., von Deimling, A., y Poustka, A. (1997). DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nature Genetics*, *17*(1), 32-39. <https://doi.org/10.1038/ng0997-32>
- Monaghan, J. R., Epp, L. G., Putta, S., Page, R. B., Walker, J. A., Beachy, C. K., Zhu, W., Pao, G. M., Verma, I. M., Hunter, T., Bryant, S. V., Gardiner, D. M., Harkins, T. T., y Voss, S. R. (2009). Microarray and cDNA sequence analysis of transcription during nerve-dependent limb regeneration. *BMC biology*, *7*, 1. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-1>
- Montecino-Rodriguez, E., Berent-Maoz, B., y Dorshkind, K. (2013). Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(3), 958-965. <https://doi.org/10.1172/JCI64096>
- Montoya-Durango, D. E., y Ramos, K. S. (2010). L1 retrotransposon and retinoblastoma: Molecular linkages between epigenetics and cancer. *Current Molecular Medicine*, *10*(5), 511-521. <https://doi.org/10.2174/156652410791608234>
- Moon, A. M., y Capecchi, M. R. (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nature Genetics*, *26*(4), 455-459. <https://doi.org/10.1038/82601>
- Moore, E. M., Maestas, D. R., Comeau, H. Y., y Elisseeff, J. H. (2021). The Immune System and Its Contribution to Variability in Regenerative Medicine. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *27*(1), 39-47. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0335>
- Morgan, T. H. (1901). *Regeneration*. Macmillan.
- Mrázek, J., Guo, X., y Shah, A. (2007). Simple sequence repeats in prokaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(20), 8472-8477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702412104>
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., y Serrano, M. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell*, *155*(5), 1104-1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>

- Muñoz-López, M., y García-Pérez, J. L. (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, *11*(2), 115-128. <https://doi.org/10.2174/138920210790886871>
- Muotri, A. R., Chu, V. T., Marchetto, M. C. N., Deng, W., Moran, J. V., y Gage, F. H. (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by I1 retrotransposition. *Nature*, *435*(7044), 903-910. <https://doi.org/10.1038/nature03663>
- Muotri, A. R., Marchetto, M. C., Coufal, N. G., y Gage, F. H. (2007). The necessary junk: new functions for transposable elements. *Human Molecular Genetics*, *16*, R159-R167. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm196>
- Murad, R., Macias-Muñoz, A., Wong, A., Ma, X., y Mortazavi, A. (2021). Coordinated Gene Expression and Chromatin Regulation during Hydra Head Regeneration. *Genome Biology and Evolution*, *13*(12), evab221. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab221>
- Muszewska, A., Hoffman-Sommer, M., y Grynberg, M. (2011). LTR Retrotransposons in Fungi. *PLoS ONE*, *6*(12), e29425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029425>
- Nacu, E., Gromberg, E., Oliveira, C. R., Drechsel, D., y Tanaka, E. M. (2016). FGF8 and SHH substitute for anterior–posterior tissue interactions to induce limb regeneration. *Nature*, *533*(7603), 407-410. <https://doi.org/10.1038/nature17972>
- Nakamura, T., Yamada, K. D., Tomii, K., y Katoh, K. (2018). Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, *34*(14), 2490-2492. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty121>
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., y Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, *393*(6683), 386-389. <https://doi.org/10.1038/30764>
- Nekrutenko, A., y Li, W.-H. (2001). Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends in Genetics*, *17*(11), 619-621. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02445-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02445-3)
- Neph, S., Kuehn, M. S., Reynolds, A. P., Haugen, E., Thurman, R. E., Johnson, A. K., Rynes, E., Maurano, M. T., Vierstra, J., Thomas, S., Sandstrom, R., Humbert, R., y Stamatoyannopoulos, J. A. (2012). BEDOPS: high-performance genomic feature operations. *Bioinformatics*, *28*(14), 1919-1920. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts277>
- Notredame, C., Higgins, D. G., y Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, *302*(1), 205-217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Novák, P., Neumann, P., y Macas, J. (2020). Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. *Nature Protocols*, *15*(11), 3745-3776. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0400-y>

- 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., Falcon, F., Knapp, D., Powell, S., Cruz, A., Cao, H., Habermann, B., Hiller, M., Tanaka, E. M., y Myers, E. W. (2018). The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, *554*(7690), 50-55. <https://doi.org/10.1038/nature25458>
- Oviedo, N. J., y Beane, W. S. (2009). Regeneration: The origin of cancer or a possible cure? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *20*(5), 557-564. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.04.005>
- Pace, J. K., y Feschotte, C. (2007). The evolutionary history of human DNA transposons: Evidence for intense activity in the primate lineage. *Genome Research*, *17*(4), 422-432. <https://doi.org/10.1101/gr.5826307>
- Parra-Olea, G., Flores-Villela, O., y Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*. <https://doi.org/10.7550/rmb.32027>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., y Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, *14*(4), 417-419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... y Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, *51*, D418-D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Paz, J. G. G. d. l., Mercado-Silva, N., Alcalá, R. E., y Zambrano, L. (2020). Signals of decline of flagship species *Ambystoma altamirani* dugès, 1895 (caudata, ambystomatidae) in a mexican natural protected area. *Herpetozoa*, *33*, 177-183. <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.33.e56588>
- Pedersen, K., Rasmussen, R. K., Dittrich, A., y Lauridsen, H. (2021). Cardiac regeneration in the axolotl is unaffected by alterations in leukocyte numbers induced by lipopolysaccharide and prednisolone. *BMC Research Notes*, *14*(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05574-z>
- Petit, F., Sears, K. E., y Ahituv, N. (2017). Limb development: A paradigm of gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, *18*(4), 245-258. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.167>
- Platt, R. N., Vandeweghe, M. W., y Ray, D. A. (2018). Mammalian transposable elements and their impacts on genome evolution. *Chromosome Research*, *26*(1), 25-43. <https://doi.org/10.1007/s10577-017-9570-z>
- Platt II, R. N., y Ray, D. A. (2012). A non-LTR retroelement extinction in *Spermophilus tridecemlineatus*. *Gene*, *500*(1), 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.051>

- Poetsch, A. R., Boulton, S. J., y Luscombe, N. M. (2018). Genomic landscape of oxidative DNA damage and repair reveals regioselective protection from mutagenesis. *Genome Biology*, *19*(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1582-2>
- Polvadore, T., y Maden, M. (2021). Retinoic acid receptors and the control of positional information in the regenerating axolotl limb. *Cells*, *10*(9), 2174. <https://doi.org/10.3390/cells10092174>
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jørgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., y Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & Development*, *15*(13), 1613-1618. <https://doi.org/10.1101/gad.198501>
- Quinlan, A. R., y Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, *26*(6), 841-842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Ramos, A. G., Mena-González, H., y Zambrano, L. (2021). The potential of temporary shelters to increase survival of the endangered mexican axolotl. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *31*(6), 1535-1542. <https://doi.org/10.1002/aqc.3520>
- Raney, B. J., Dreszer, T. R., Barber, G. P., Clawson, H., Fujita, P. A., Wang, T., Nguyen, N., Paten, B., Zweig, A. S., Karolchik, D., y Kent, W. J. (2014). Track data hubs enable visualization of user-defined genome-wide annotations on the UCSC Genome Browser. *Bioinformatics*, *30*(7), 1003-1005. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt637>
- Rangwala, S. H., Zhang, L., y Kazazian, H. H. (2009). Many LINE1 elements contribute to the transcriptome of human somatic cells. *Genome Biology*, *10*(9), R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-r100>
- Recuero, E., Cruzado-Cortes, J., Parra-Olea, G., y Zamudio, K. R. (2010). Urban Aquatic Habitats and Conservation of Highly Endangered Species: The Case of *Ambystoma mexicanum* (Caudata, Ambystomatidae). *Annales Zoologici Fennici*, *47*(4), 223-238. <https://doi.org/10.5735/086.047.0401>
- Reddington, J. P., Perricone, S. M., Nestor, C. E., Reichmann, J., Youngson, N. A., Suzuki, M., Reinhardt, D., Dunican, D. S., Prendergast, J. G., Mjoseng, H., Ramsahoye, B. H., Whitelaw, E., Grealley, J. M., Adams, I. R., Bickmore, W. A., y Meehan, R. R. (2013). Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in de-repression of Polycomb target genes. *Genome Biology*, *14*(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-3-r25>
- Reiß, C., Hoßfeld, U., y Olsson, L. (2014). 150 Jahre Axolotl. *Biologie in unserer Zeit*, *44*(3), 188-195. <https://doi.org/10.1002/biuz.201410538>
- Ren, Y., Zhang, J., Wang, Y., Chen, J., Liang, C., Li, R., y Li, Q. (2020). Non-specific immune factors differences in coelomic fluid from polian vesicle and coelom of *Apostichopus japonicus*, and their early response after evisceration. *Fish & Shellfish Immunology*, *98*, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.094>

- Rice, P., Longden, I., y Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16(6), 276-277. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2)
- Richard, G.-F., Kerrest, A., y Dujon, B. (2008). Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 72(4), 686-727. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00011-08>
- Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M. C., Morton, J. P., Sansom, O. J., Zender, L., y Keyes, W. M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes & Development*, 31(2), 172-183. <https://doi.org/10.1101/gad.290635.116>
- Roy, S., y Gardiner, D. M. (2002). Cyclopamine induces digit loss in regenerating axolotl limbs. *Journal of Experimental Zoology*, 293(2), 186-190. <https://doi.org/10.1002/jez.10110>
- Roy, S., y Lévesque, M. (2006). Limb regeneration in axolotl: Is it superhealing? *The Scientific World Journal*, 6, 12-25. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.324>
- Sader, F., Denis, J.-F., Laref, H., y Roy, S. (2019). Epithelial to mesenchymal transition is mediated by both TGF- β canonical and non-canonical signaling during axolotl limb regeneration. *Scientific Reports*, 9(1), 1144. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38171-5>
- Saito, N., Nishimura, K., Makanae, A., y Satoh, A. (2019). Fgf- and Bmp-signaling regulate gill regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Biology*, 452(2), 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.04.011>
- Saldi, T. K., Gonzales, P. K., LaRocca, T. J., y Link, C. D. (2019). Neurodegeneration, heterochromatin, and double-stranded RNA. *Journal of Experimental Neuroscience*, 13, 1179069519830697. <https://doi.org/10.1177/1179069519830697>
- Sámano, C., González-Barrios, R., Castro-Azpiroz, M., Torres-García, D., Ocampo-Cervantes, J. A., Otero-Negrete, J., y Soto-Reyes, E. (2021). Genomics and epigenomics of axolotl regeneration. *International Journal of Developmental Biology*, 65(7), 465-474. <https://doi.org/10.1387/ijdb.200276cs>
- Sarig, R., Rimmer, R., Bassat, E., Zhang, L., Umansky, K. B., Lendengolts, D., Perlmoter, G., Yaniv, K., y Tzahor, E. (2019). Transient p53-Mediated Regenerative Senescence in the Injured Heart. *Circulation*, 139(21), 2491-2494. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040125>
- Sasai, N., Nakao, M., y Defossez, P.-A. (2010). Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 5015-5022. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq280>
- Sassaman, D. M., Dombroski, B. A., Moran, J. V., Kimberland, M. L., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Gabriel, A., Swergold, G. D., y Kazazian, H. H. (1997). Many human 11 elements are capable of retrotransposition. *Nature Genetics*, 16(1), 37-43. <https://doi.org/10.1038/ng0597-37>

- Satoh, A., Graham, G. M. C., Bryant, S. V., y Gardiner, D. M. (2008). Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental Biology*, 319(2), 321-335. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.030>
- Satoh, A., Bryant, S. V., y Gardiner, D. M. (2012). Nerve signaling regulates basal keratinocyte proliferation in the blastema apical epithelial cap in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental Biology*, 366(2), 374-381. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.03.022>
- Satoh, A., makanae, A., Hirata, A., y Satou, Y. (2011). Blastema induction in aneurogenic state and *Prrx-1* regulation by MMPs and FGFs in *Ambystoma mexicanum* limb regeneration. *Developmental Biology*, 355(2), 263-274. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.04.017>
- Satoh, A., Makanae, A., Nishimoto, Y., y Mitogawa, K. (2016). FGF and BMP derived from dorsal root ganglia regulate blastema induction in limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Biology*, 417(1), 114-125. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.005>
- Schatz, O., Langer, E., y Ben-Arie, N. (2014). Gene dosage of the transcription factor Fingerin (bHLHA9) affects digit development and links syndactyly to ectrodactyly. *Human Molecular Genetics*, 23(20), 5394-5401. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu257>
- Schneider, B. K., Sun, S., Lee, M., Li, W., Skvir, N., Neretti, N., Vijg, J., y Secombe, J. (2023). Expression of retrotransposons contributes to aging in *Drosophila*. *Genetics*, 224(2), iyad073. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad073>
- Schurch, N. J., Schofield, P., Gierliński, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., Wrobel, N., Gharbi, K., Simpson, G. G., Owen-Hughes, T., Blaxter, M., y Barton, G. J. (2016). How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *RNA*, 22(6), 839-851. <https://doi.org/10.1261/rna.053959.115>
- Sedivy, J. M., Kreiling, J. A., Neretti, N., Cecco, M. D., Criscione, S. W., Hofmann, J. W., Zhao, X., Ito, T., y Peterson, A. L. (2013). Death by transposition – the enemy within? *BioEssays*, 35(12), 1035-1043. <https://doi.org/10.1002/bies.201300097>
- SEMARNAT. (2019). Modificación del Anexo Normativo III, Lista de especies en riesgo de la 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, publicada el 30 de diciembre de 2010. [LEX-FAOC192085]. *Diario Oficial de la Federación*. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5578808&fecha=14/11/2019#
- Shanmugasundaram, M. (2015, 17 de septiembre). *Gene and protein interactions in limb development: The case of msx and gli3* [Doctoral thesis]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. Consultado el 3 de febrero de 2023, desde <https://theses.hal.science/tel-01368052>

- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., e Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shaw, G., y Nodder, F. P. (1789). *The Naturalist's Miscellany* (Vol. v.1 [1789-1790]). Nodder & Co. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4883>
- Shimokawa, T., Yasutaka, S., Kominami, R., y Shinohara, H. (2013). *Lmx-1b* and *Wnt-7a* expression in axolotl limb during development and regeneration. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 89(4), 119-124. <https://doi.org/10.2535/ofaj.89.119>
- Shioda, C., Uchida, K., y Nakayama, H. (2011). Pathological Features of Olfactory Neuroblastoma in an Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(8), 1109-1111. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0105>
- Sibai, M., Parlayan, C., Tuğlu, P., Öztürk, G., y Demircan, T. (2019). Integrative analysis of axolotl gene expression data from regenerative and wound healing limb tissues. *Scientific Reports*, 9(1), 20280. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56829-6>
- Simkin, J., Gawriluk, T. R., Gensel, J. C., y Seifert, A. W. (2017). Macrophages are necessary for epimorphic regeneration in African spiny mice. *eLife*, 6, e24623. <https://doi.org/10.7554/eLife.24623>
- Simkin, J., Sammarco, M. C., Dawson, L. A., Schanes, P. P., Yu, L., y Muneoka, K. (2015). The mammalian blastema: regeneration at our fingertips. *Regeneration*, 2(3), 93-105. <https://doi.org/10.1002/reg2.36>
- Simon, M., Meter, M. V., Ablueva, J., Ke, Z., Gonzalez, R. S., Taguchi, T., Cecco, M. D., Leonova, K. I., Kogan, V., Helfand, S. L., Neretti, N., Roichman, A., Cohen, H. Y., Meer, M. V., Gladyshev, V. N., Antoch, M. P., Gudkov, A. V., Sedivy, J. M., Seluanov, A., y Gorbunova, V. (2019). LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. *Cell Metabolism*, 29(4), 871-885.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.014>
- Singer, M. (1974). Neurotrophic control of limb regeneration in the newt*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 228(1), 308-321. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb20520.x>
- Singer, M. (1978). On the Nature of the Neurotrophic Phenomenon in Urodele Limb Regeneration. *American Zoologist*, 18(4), 829-841. <https://doi.org/10.1093/icb/18.4.829>
- Sinibaldi-Vallebona, P., Lavia, P., Garaci, E., y Spadafora, C. (2006). A role for endogenous reverse transcriptase in tumorigenesis and as a target in differentiating cancer therapy. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 45(1), 1-10. <https://doi.org/10.1002/gcc.20266>
- Slotkin, R. K., y Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 272-285. <https://doi.org/10.1038/nrg2072>
- Smit, A. F. A., Hubley, R., y Green, P. (2013). *RepeatMasker Open-4.0*. <http://www.repeatmasker.org>

- Smith, H. (1989, 27 de abril). Discovery of the axolotl and its early history in biological research. En J. B. Armstrong y G. M. Malacinski (Eds.), *Developmental Biology of the Axolotl* (pp. 3-12). Oxford University Press.
- Smith, J. J., Timoshevskaya, N., Timoshevskiy, V. A., Keinath, M. C., Hardy, D., y Voss, S. R. (2019). A chromosome-scale assembly of the axolotl genome. *Genome Research*, 29(2), 317-324. <https://doi.org/10.1101/gr.241901.118>
- Soneson, C., Love, M. I., y Robinson, M. D. (2016). Differential analyses for RNA-seq: Transcript-level estimates improve gene-level inferences [version 2; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, 4(1521). <https://doi.org/10.12688/f1000research.7563.2>
- Sousounis, K., Bhavsar, R., Looso, M., Krüger, M., Beebe, J., Braun, T., y Tsonis, P. A. (2014). Molecular signatures that correlate with induction of lens regeneration in newts: lessons from proteomic analysis. *Human Genomics*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40246-014-0022-y>
- Sousounis, K., Bryant, D. M., Martinez Fernandez, J., Eddy, S. S., Tsai, S. L., Gundberg, G. C., Han, J., Courtemanche, K., Levin, M., y Whited, J. L. (2020). Eya2 promotes cell cycle progression by regulating DNA damage response during vertebrate limb regeneration. *eLife*, 9, e51217. <https://doi.org/10.7554/eLife.51217>
- Srinivasachar Badarinarayan, S., Shcherbakova, I., Langer, S., Koepke, L., Preising, A., Hotter, D., Kirchhoff, F., Sparrer, K. M. J., Schotta, G., y Sauter, D. (2020). HIV-1 infection activates endogenous retroviral promoters regulating antiviral gene expression. *Nucleic Acids Res*, 10890-10908. Consultado el 17 de febrero de 2023, desde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7641743>
- Stegeman, R., y Weake, V. M. (2017). Transcriptional Signatures of Aging. *Journal of Molecular Biology*, 429(16), 2427-2437. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.06.019>
- Steinert, N. D., Potts, G. K., Wilson, G. M., Klamen, A. M., Lin, K.-H., Hermanson, J. B., McNally, R. M., Coon, J. J., y Hornberger, T. A. (2021). Mapping of the contraction-induced phosphoproteome identifies TRIM28 as a significant regulator of skeletal muscle size and function. *Cell Reports*, 34(9), 108796. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108796>
- Stephens, M. (2017). False discovery rates: a new deal. *Biostatistics*, 18(2), 275-294. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxw041>
- Stewart, R., Rascón, 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., y Dewey, C. N. (2013). Comparative RNA-seq analysis in the unsequenced axolotl: The oncogene burst highlights early gene expression in the blastema. *PLOS Computational Biology*, 9(3), e1002936. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002936>

- Stopper, G. F., y Wagner, G. P. (2007). Inhibition of sonic hedgehog signaling leads to posterior digit loss in *ambystoma mexicanum*: Parallels to natural digit reduction in urodeles. *Developmental Dynamics*, 236(1), 321-331. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21025>
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., y Keyes, W. M. (2013). Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell*, 155(5), 1119-1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>
- Sun, F., Jiang, F., Zhang, N., Li, H., Tian, W., y Liu, W. (2020). Upregulation of Prickle2 Ameliorates Alzheimer's Disease-Like Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 565020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.565020>
- Swanson, L. C., Trujillo, E. A., Thiede, G. H., Katzenberger, R. J., Shishkova, E., Coon, J. J., Ganetzky, B., y Wassarman, D. A. (2020). Survival Following Traumatic Brain Injury in *Drosophila* Is Increased by Heterozygosity for a Mutation of the NF- κ B Innate Immune Response Transcription Factor Relish. *Genetics*, 216(4), 1117-1136. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303776>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., y Mering, C. v. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47, D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., y von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49, D605-D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
- Taka, J. R. H., Sun, Y., y Goldstone, D. C. (2022). Mapping the interaction between trim28 and the KRAB domain at the center of trim28 silencing of endogenous retroviruses. *Protein Science*, 31(10), e4436. <https://doi.org/10.1002/pro.4436>
- Tang, W. J., Watson, C. J., Olmstead, T., Allan, C. H., y Kwon, R. Y. (2022). Single-cell resolution of MET- and EMT-like programs in osteoblasts during zebrafish fin regeneration. *iScience*, 25(2). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103784>
- Tank, P. W., Carlson, B. M., y Connelly, T. G. (1976). A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *ambystoma mexicanum*. *Journal of Morphology*, 150(1), 117-128. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051500106>

- Thompson, P. J., Macfarlan, T. S., y Lorincz, M. C. (2016). Long terminal repeats: from parasitic elements to building blocks of the transcriptional regulatory repertoire. *Molecular cell*, 62(5), 766-776. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.029>
- Torok, M. A., Gardiner, D. M., Izipisúa-Belmonte, J.-C., y Bryant, S. V. (1999). Sonic hedgehog (shh) expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Journal of Experimental Zoology*, 284(2), 197-206. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990701\)284:2<197::AID-JEZ9>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990701)284:2<197::AID-JEZ9>3.0.CO;2-F)
- Torok, M. A., Gardiner, D. M., Shubin, N. H., y Bryant, S. V. (1998). Expression of *HoxD* Genes in Developing and Regenerating Axolotl Limbs. *Developmental Biology*, 200(2), 225-233. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8956>
- Torres López, J. C. (2019). Paleografía y traducción del náhuatl al español de los capítulos 1 y 2 del libro VII del Códice Florentino. *Estudios de Cultura Náhuatl*, (57), 217-236. Consultado el 27 de febrero de 2022, desde <https://nahuatl.historicas.unam.mx/index.php/ecn/article/view/77879>
- Touati, R., Tajouri, A., Mesaoudi, I., Oueslati, A. E., Lachiri, Z., y Kharrat, M. (2021). New methodology for repetitive sequences identification in human X and Y chromosomes. *Biomedical Signal Processing and Control*, 64, 102207. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2020.102207>
- Treangen, T. J., Abraham, A.-L., Touchon, M., y Rocha, E. P. (2009). Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 539-571. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00169.x>
- Tsai, S. L., Baselga-Garriga, C., y Melton, D. A. (2019). Blastemal progenitors modulate immune signaling during early limb regeneration. *Development*, 146(1), dev169128. <https://doi.org/10.1242/dev.169128>
- Tsarouchas, T. M., Wehner, D., Cavone, L., Munir, T., Keatinge, M., Lambertus, M., Underhill, A., Barrett, T., Kassapis, E., Ogryzko, N., Feng, Y., van Ham, T. J., Becker, T., y Becker, C. G. (2018). Dynamic control of proinflammatory cytokines il-1 β and tnf- α by macrophages in zebrafish spinal cord regeneration. *Nature Communications*, 9(1), 4670. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07036-w>
- Tsonis, P. A. (1983). Effects of carcinogens on regenerating and non-regenerating limbs in amphibia (review). *Anticancer Research*, 3(3), 195-202.
- Tsonis, P. A., y Eguchi, G. (1981). Carcinogens on Regeneration: Effects of N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine and 4-Nitroquinoline-1-Oxide on Limb Regeneration in Adult Newts. *Differentiation*, 20(1), 52-60. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1981.tb01155.x>
- Tycko, J., DelRosso, N., Hess, G. T., Aradhana, Banerjee, A., Mukund, A., Van, M. V., Ego, B. K., Yao, D., Spees, K., Suzuki, P., Marinov, G. K., Kundaje, A., Bassik, M. C., y Bintu, L. (2020).

- High-Throughput Discovery and Characterization of Human Transcriptional Effectors. *Cell*, 183(7), 2020-2035.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.024>
- Ulanovskaya, O. A., Zuhl, A. M., y Cravatt, B. F. (2013). NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. *Nature Chemical Biology*, 9(5), 300-306. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1204>
- Urrutia, R. (2003). KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biology*, 4(10), 231. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-10-231>
- Van Meter, M., Kashyap, M., Rezazadeh, S., Geneva, A. J., Morello, T. D., Seluanov, A., y Gorbunova, V. (2014). SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nature Communications*, 5(1), 5011. <https://doi.org/10.1038/ncomms6011>
- van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439-446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>
- Vieira, W. A., Wells, K. M., y McCusker, C. D. (2020). Advancements to the Axolotl Model for Regeneration and Aging. *Gerontology*, 66(3), 212-222. <https://doi.org/10.1159/000504294>
- Vieira, W. A., Wells, K. M., Raymond, M. J., De Souza, L., Garcia, E., y McCusker, C. D. (2019). FGF, BMP, and RA signaling are sufficient for the induction of complete limb regeneration from non-regenerating wounds on *Ambystoma mexicanum* limbs. *Developmental Biology*, 451(2), 146-157. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.04.008>
- Vinarsky, V., Atkinson, D. L., Stevenson, T. J., Keating, M. T., y Odelberg, S. J. (2005). Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. *Developmental Biology*, 279(1), 86-98. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.12.003>
- Vincent, E., Villiard, E., Sader, F., Dhakal, S., Kwok, B. H., y Roy, S. (2020). BMP signaling is essential for sustaining proximo-distal progression in regenerating axolotl limbs. *Development*, 147(14), dev170829. <https://doi.org/10.1242/dev.170829>
- Vissing, H., Meyer, W.-H., Aagaard, L., Tommerup, N., y Thiesen, H.-J. (1995). Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins. *FEBS Letters*, 369(2), 153-157. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00728-R](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00728-R)
- Vorontsova, M. A., y Liosner, L. D. (1960). *Asexual propagation and regeneration*. Pergamon Press.
- Voss, S. R., y Smith, J. J. (2005). Evolution of Salamander Life Cycles: A Major-Effect Quantitative Trait Locus Contributes to Discrete and Continuous Variation for Metamorphic Timing. *Genetics*, 170(1), 275-281. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.038273>
- Voss, S. R., Murrugarra, D., Jensen, T. B., y Monaghan, J. R. (2018). Transcriptional correlates of proximal-distal identify and regeneration timing in axolotl limbs. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 208, 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.10.010>

- Voss, S. R., Muzinic, L., Muzinic, C., y Zimmerman, G. (2022). *How long does it take for a salamander to regenerate a limb?* [Sal-Site]. Consultado el 12 de marzo de 2023, desde <https://ambystoma.uky.edu/19-fun-facts-cat/71-how-long-does-it-take-for-a-salamander-to-regenerate-a-limb>
- Voss, S. R., Palumbo, A., Nagarajan, R., Gardiner, D. M., Muneoka, K., Stromberg, A. J., y Athipozhy, A. T. (2015). Gene expression during the first 28 days of axolotl limb regeneration I: Experimental design and global analysis of gene expression. *Regeneration*, 2(3), 120-136. <https://doi.org/10.1002/reg2.37>
- Waddington, C. H. (1935). Cancer and the theory of organisers. *Nature*, 135(3416), 606-608. <https://doi.org/10.1038/135606a0>
- Wallace, H. H. (1981). *Vertebrate limb regeneration*. Wiley.
- Walters, H. E., y Yun, M. H. (2020). Rising from the ashes: cellular senescence in regeneration. *Current Opinion in Genetics & Development*, 64, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.06.002>
- Wang, M.-H., Wu, C.-H., Huang, T.-Y., Sung, H.-W., Chiou, L.-L., Lin, S.-P., y Lee, H.-S. (2019). Nerve-mediated expression of histone deacetylases regulates limb regeneration in axolotls. *Developmental Biology*, 449(2), 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.02.011>
- Wang, R., Li, H., Wu, J., Cai, Z.-Y., Li, B., Ni, H., Qiu, X., Chen, H., Liu, W., Yang, Z.-H., Liu, M., Hu, J., Liang, Y., Lan, P., Han, J., y Mo, W. (2020). Gut stem cell necroptosis by genome instability triggers bowel inflammation. *Nature*, 580(7803), 386-390. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2127-x>
- Wang, Y., Gallagher-Jones, M., Sušac, L., Song, H., y Feigon, J. (2020). A structurally conserved human and Tetrahymena telomerase catalytic core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(49), 31078-31087. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011684117>
- Wei, K., Aldaimalani, R., Mai, D., Zinshteyn, D., Prv, S., Blumenstiel, J. P., Kelleher, E. S., y Brooks, E. (2022, 1 de junio). Rethinking the “gypsy” retrotransposon: A roadmap for community-driven reconsideration of problematic gene names. <https://doi.org/10.31219/osf.io/fma57>
- Wells, J. N., y Feschotte, C. (2020). A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements. *Annual review of genetics*, 54, 539-561. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-040620-022145>
- Wells, K. M., Kelley, K., Baumel, M., Vieira, W. A., y McCusker, C. D. (2021). Neural control of growth and size in the axolotl limb regenerate (K. VijayRaghavan y M. Harris, Eds.). *eLife*, 10, e68584. <https://doi.org/10.7554/eLife.68584>
- Whited, J. L., Lehoczy, J. A., Austin, C. A., y Tabin, C. J. (2011). Dynamic expression of two thrombospondins during axolotl limb regeneration. *Developmental Dynamics*, 240(5), 1249-1258. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22548>

- Whited, J. L., Lehoczky, J. A., y Tabin, C. J. (2012). Inducible genetic system for the axolotl. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13662-13667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211816109>
- Whittemore, K., Vera, E., Martínez-Nevaldo, E., Sanpera, C., y Blasco, M. A. (2019). Telomere shortening rate predicts species life span. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(30), 15122-15127. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902452116>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wiegand, S., Meier, D., Seehafer, C., Malicki, M., Hofmann, P., Schmith, A., Winckler, T., Földesi, B., Boesler, B., Nellen, W., Reimegård, J., Käller, M., Hällman, J., Emanuelsson, O., Avesson, L., Söderbom, F., y Hammann, C. (2014). The Dictyostelium discoideum RNA-dependent RNA polymerase RrpC silences the centromeric retrotransposon DIRS-1 post-transcriptionally and is required for the spreading of RNA silencing signals. *Nucleic Acids Research*, 42(5), 3330-3345. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1337>
- Wiench, M., John, S., Baek, S., Johnson, T. A., Sung, M.-H., Escobar, T., Simmons, C. A., Pearce, K. H., Biddie, S. C., Sabo, P. J., Thurman, R. E., Stamatoyannopoulos, J. A., y Hager, G. L. (2011). DNA methylation status predicts cell type-specific enhancer activity. *The EMBO Journal*, 30(15), 3028-3039. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.210>
- Wiese, R., Eiglsperger, M., y Kaufmann, M. (2004). yFiles — visualization and automatic layout of graphs. En M. Jünger y P. Mutzel (Eds.), *Graph drawing software* (pp. 173-191). Springer. Consultado el 31 de enero de 2023, desde https://doi.org/10.1007/978-3-642-18638-7_8
- Wilkins, A. S. (2010). The enemy within: An epigenetic role of retrotransposons in cancer initiation. *BioEssays*, 32(10), 856-865. <https://doi.org/10.1002/bies.201000008>
- Wischin, S., Castañeda-Patlán, C., Robles-Flores, M., y Chimal-Monroy, J. (2017a). Chemical activation of Wnt/ β -catenin signalling inhibits innervation and causes skeletal tissue malformations during axolotl limb regeneration. *Mechanisms of Development*, 144, 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.01.005>
- Wischin, S., Castañeda-Patlán, C., Robles-Flores, M., y Chimal-Monroy, J. (2017b). Data on chemical activation of Wnt/ β -catenin during axolotl limb regeneration. *Data in Brief*, 11, 562-566. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.02.048>
- Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D., y Bonventre, J. V. (1994). The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4514-4518. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4514>
- Wood, J. G., Jones, B. C., Jiang, N., Chang, C., Hosier, S., Wickremesinghe, P., Garcia, M., Hartnett, D. A., Burhenn, L., Neretti, N., y Helfand, S. L. (2016). Chromatin-modifying genetic

- interventions suppress age-associated transposable element activation and extend life span in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11277-11282. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604621113>
- Woodcock, M. R., Vaughn-Wolfe, J., Elias, A., Kump, D. K., Kendall, K. D., Timoshevskaya, N., Timoshevskiy, V., Perry, D. W., Smith, J. J., Spiewak, J. E., Parichy, D. M., y Voss, S. R. (2017). Identification of mutant genes and introgressed tiger salamander DNA in the laboratory axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Scientific Reports*, 7(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00059-1>
- Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., y Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, 2(3). <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>
- Wu, Y.-C., Franzenburg, S., Ribes, M., y Pita, L. (2022). Wounding response in porifera (sponges) activates ancestral signaling cascades involved in animal healing, regeneration, and cancer. *Scientific Reports*, 12(1), 1307. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05230-x>
- Wu, Z., Lee, S., Abrams, W., Weissman, D., y Malamud, D. (2006). The N-terminal SRCR-SID domain of gp-340 interacts with HIV type 1 gp120 sequences and inhibits viral infection. *AIDS research and human retroviruses*, 22(6), 508-515. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.22.508>
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., y McKeon, F. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 398(6729), 714-718. <https://doi.org/10.1038/19539>
- Yang, E. V., Gardiner, D. M., Carlson, M. R., Nugas, C. A., y Bryant, S. V. (1999). Expression of mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Developmental Dynamics*, 216(1), 2-9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199909\)216:1<2::AID-DVDY2>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199909)216:1<2::AID-DVDY2>3.0.CO;2-P)
- Ye, F., Zhang, G., E., W., Chen, H., Yu, C., Yang, L., Fu, Y., Li, J., Fu, S., Sun, Z., Fei, L., Guo, Q., Wang, J., Xiao, Y., Wang, X., Zhang, P., Ma, L., Ge, D., Xu, S., ... y Guo, G. (2022). Construction of the axolotl cell landscape using combinatorial hybridization sequencing at single-cell resolution. *Nature Communications*, 13(1), 4228. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31879-z>
- Young, H. E., Bailey, C. F., y Dalley, B. K. (1983). Gross morphological analysis of limb regeneration in postmetamorphic adult *Ambystoma*. *The Anatomical Record*, 206(3), 295-306. <https://doi.org/10.1002/ar.1092060308>
- Yousefzadeh, M. J., Flores, R. R., Zhu, Y., Schmiechen, Z. C., Brooks, R. W., Trussoni, C. E., Cui, Y., Angelini, L., Lee, K.-A., McGowan, S. J., Burrack, A. L., Wang, D., Dong, Q., Lu, A., Sano, T., O'Kelly, R. D., McGuckian, C. A., Kato, J. I., Bank, M. P., ... y Niedernhofer, L. J. (2021).

- An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. *Nature*, 594(7861), 100-105. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03547-7>
- Youssef, N., Budd, A., y Bielawski, J. P. (2019). Introduction to genome biology and diversity. En M. Anisimova (Ed.), *Evolutionary genomics: Statistical and computational methods* (pp. 3-31). Springer. Consultado el 15 de febrero de 2023, desde https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_1
- Yu, Q., y Yun, M. H. (2020). Interconnection between cellular senescence, regeneration and ageing in salamanders. En D. Muñoz-Espin y M. Demaria (Eds.), *Senolytics in disease, ageing and longevity* (pp. 43-62). Springer International Publishing. Consultado el 15 de febrero de 2024, desde https://doi.org/10.1007/978-3-030-44903-2_3
- Yun, M. H. (2015). Changes in Regenerative Capacity through Lifespan. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25392-25432. <https://doi.org/10.3390/ijms161025392>
- Yun, M. H. (2021). Salamander Insights Into Ageing and Rejuvenation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689062>
- Yun, M. H., Davaapil, H., y Brockes, J. P. (2015). Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *eLife*, 4, e05505. <https://doi.org/10.7554/eLife.05505>
- Yun, M. H., Gates, P. B., y Brockes, J. P. (2013). Regulation of p53 is critical for vertebrate limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), 17392-17397. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310519110>
- yWorks GmbH. (2023, 20 de marzo). *yFiles Layout Algorithms for Cytoscape* (Ver. 1.1.3). yWorks GmbH. Consultado el 20 de diciembre de 2023, desde <https://www.yworks.com/products/yfiles-layout-algorithms-for-cytoscape>
- Zambrano, L. (2006). The Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Froglog*, (78), 2-3. Consultado el 13 de febrero de 2024, desde <https://www.amphibians.org/wp-content/uploads/2018/12/Froglog78.pdf>
- Zambrano, L., Rivas, M. I., Uriel-Sumano, C., Rojas-Villaseñor, R., Rubio, M., Mena, H., Vázquez-Mendoza, D. L., y Tovar-Garza, A. (2020). Adapting wetland restoration practices in urban areas: Perspectives from xochimilco in mexico city. *Ecological Restoration*, 38(2), 114-123. <https://doi.org/10.3368/er.38.2.114>
- Zambrano González, L., Reynoso, V. H., y Herrera, G. (2003). *Abundancia y estructura poblacional del axolotl (Ambystoma mexicanum) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco*. (Informe final SNIB CONABIO proyecto No. AS004.). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/cgi-bin/datos.cgi?Letras=AS&Numero=4>

- Zhang, B., y Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1128>
- Zhang, Y., Parmigiani, G., y Johnson, W. E. (2020). ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(3), lqaa078. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa078>
- Zhu, W., Kuo, D., Nathanson, J., Satoh, A., Pao, G. M., Yeo, G. W., Bryant, S. V., Voss, S. R., Gardiner, D. M., y Hunter, T. (2012). Retrotransposon long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) is activated during salamander limb regeneration. *Development, growth & differentiation*, 54(7), 673-685. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01368.x>
- Zhu, W., Pao, G. M., Satoh, A., Cummings, G., Monaghan, J. R., Harkins, T. T., Bryant, S. V., Randal Voss, S., Gardiner, D. M., y Hunter, T. (2012). Activation of germline-specific genes is required for limb regeneration in the Mexican axolotl. *Developmental Biology*, 370(1), 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.021>

Apéndice

A. Calidad de las muestras de RNA extraídas de tejidos de ajolotes nativos

Cuadro A.1. Calidad de las muestras de RNA extraídas de tejidos de ajolotes nativos.

Muestra	Grupo de edad	Tejido	Después de la extracción de RNA (INCan)			Antes de la preparación de la librería (CD Genomics)			
			RIN ^o	28S/18S (Área)	Concentración (ng/μL)	Volumen (μL)	Concentración (ng/μL)	Cantidad (ng)	RIN ^o
A-L1	Adulto	Extremidad	6.8	1.1	19.2	21	37.4	785.4	7.3
A-L2	Adulto	Extremidad	8.6	1.3	38.6	21	36	756	8.3
SA-L1	Subadulto	Extremidad	7.2	1.1	119	20	35	700	7.5
SA-L2	Subadulto	Extremidad	9.1	1.7	169	20	33	660	8.9
SA-L3	Subadulto	Extremidad	8.2	1.5	50.8	21	34.8	730.8	8.2
SA-L4	Subadulto	Extremidad	7.7	1.1	74.1	20	30	600	6.8
SA-L5	Subadulto	Extremidad	7	0.9	45.6	21	31.6	663.6	6.7
SA-B1	Subadulto	Blastema	9.1	1.5	6.93	20	2.44	48.8	9.5
SA-B2	Subadulto	Blastema	8.5	1.8	8.79	18	1.31	23.58	9.4
SA-B3	Subadulto	Blastema	6.9	1.3	3.65	28	0.55	15.4	9.3
SA-B4	Subadulto	Blastema	8.3	1.3	8.91	19	1.84	34.96	8.8
SA-B5	Subadulto	Blastema	9.1	1.4	8.03	20	11.8	236	8.1

B. Metadatos de las muestras de secuenciación de RNA analizadas en este trabajo

Cuadro B.1. Metadatos de las muestras de secuenciación de RNA analizadas en este trabajo.

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SA-B1	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	blastema de extremidad	blastema de la extremidad	subadulto	243.334	10	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-B2	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	blastema de extremidad	blastema de la extremidad	subadulto	243.334	10	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-B3	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	blastema de extremidad	blastema de la extremidad	subadulto	243.334	10	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-B4	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	blastema de extremidad	blastema de la extremidad	subadulto	243.334	10	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-B5	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	blastema de extremidad	blastema de la extremidad	subadulto	243.334	10	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-L1	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	extremidad	extremidad	subadulto	243.334	no aplicable	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-L2	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	extremidad	extremidad	subadulto	243.334	no aplicable	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-L3	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	extremidad	extremidad	subadulto	243.334	no aplicable	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-L4	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	extremidad	extremidad	subadulto	243.334	no aplicable	macho	Xochimilco (wild-type)
SA-L5	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	extremidad	extremidad	subadulto	243.334	no aplicable	macho	Xochimilco (wild-type)
A-L1	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	extremidad	extremidad	adulto	2920	no aplicable	macho	Xochimilco (wild-type)
A-L2	no aplicable	GSE237864	Este trabajo	extremidad	extremidad	adulto	2920	no aplicable	macho	Xochimilco (wild-type)
SRR15610216	SRR15610216	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	vejiga	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610217	SRR15610217	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	vejiga	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR15610218	SRR15610218	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cerebro	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610219	SRR15610219	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cerebro	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610220	SRR15610220	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cámara cloacal	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610221	SRR15610221	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cámara cloacal	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610222	SRR15610222	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	ojo	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610223	SRR15610223	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	ojo	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610224	SRR15610224	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	extremidad	extremidad anterior	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610225	SRR15610225	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	extremidad	extremidad anterior	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610226	SRR15610226	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	branquias	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610227	SRR15610227	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	branquias	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610228	SRR15610228	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	gónada	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610229	SRR15610229	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	gónada	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610230	SRR15610230	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	corazón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610231	SRR15610231	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	corazón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610232	SRR15610232	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	extremidad	extremidad posterior	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610233	SRR15610233	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	extremidad	extremidad posterior	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610234	SRR15610234	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	intestino	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR15610235	SRR15610235	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	intestino	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610236	SRR15610236	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	riñón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610237	SRR15610237	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	riñón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610238	SRR15610238	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	hígado	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610239	SRR15610239	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	hígado	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610240	SRR15610240	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	pulmón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610241	SRR15610241	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	pulmón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610242	SRR15610242	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	piel	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610243	SRR15610243	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	piel	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610244	SRR15610244	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	bazo	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610245	SRR15610245	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	bazo	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610246	SRR15610246	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	estómago	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610247	SRR15610247	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	estómago	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610248	SRR15610248	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cola	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610249	SRR15610249	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cola	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610250	SRR15610250	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	vejiga	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610251	SRR15610251	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	vejiga	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR15610252	SRR15610252	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cerebro	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610253	SRR15610253	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cámara cloacal	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610254	SRR15610254	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cámara cloacal	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610255	SRR15610255	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	ojo	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610256	SRR15610256	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	ojo	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610257	SRR15610257	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	extremidad	extremidad anterior	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610258	SRR15610258	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	corazón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610259	SRR15610259	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	extremidad	extremidad posterior	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610260	SRR15610260	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	extremidad	extremidad posterior	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610261	SRR15610261	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	intestino	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610262	SRR15610262	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	intestino	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610263	SRR15610263	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	riñón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610264	SRR15610264	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	riñón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610265	SRR15610265	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	hígado	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610266	SRR15610266	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	hígado	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610267	SRR15610267	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	pulmón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610268	SRR15610268	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	pulmón	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR15610269	SRR15610269	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	piel	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610270	SRR15610270	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	piel	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610271	SRR15610271	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	bazo	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610272	SRR15610272	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	bazo	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610273	SRR15610273	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	estómago	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610274	SRR15610274	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	estómago	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610275	SRR15610275	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cola	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR15610276	SRR15610276	PRJ-NA757699	Ye <i>et al.</i> (2022)	no extremidad	cola	adulto	365	no aplicable	no determinado	d/d
SRR2885267	SRR2885267	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	hueso	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885268	SRR2885268	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	hueso	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885269	SRR2885269	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	hueso	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885270	SRR2885270	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	cartílago del brazo anterior	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885271	SRR2885271	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	cartílago del brazo anterior	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885273	SRR2885273	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	cartílago del brazo anterior	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR2885274	SRR2885274	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	cartílago de la muñeca	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885275	SRR2885275	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	cartílago de la muñeca	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885283	SRR2885283	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	cartílago de la muñeca	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885284	SRR2885284	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	ovarios	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado
SRR2885285	SRR2885285	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	ovarios	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado
SRR2885286	SRR2885286	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	ovarios	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado
SRR2885287	SRR2885287	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	testículos	adulto	no determinado	no aplicable	macho	no determinado
SRR2885288	SRR2885288	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	testículos	adulto	no determinado	no aplicable	macho	no determinado
SRR2885289	SRR2885289	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	testículos	adulto	no determinado	no aplicable	macho	no determinado
SRR2885290	SRR2885290	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	testículos	adulto	no determinado	no aplicable	macho	no determinado
SRR2885291	SRR2885291	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	vaso sanguíneo	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885293	SRR2885293	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	vaso sanguíneo	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR2885316	SRR2885316	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	vaso sanguíneo	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885553	SRR2885553	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	blastema de extremidad	blastema distal de la extremidad	adulto	no determinado	no determinado	no determinado	no determinado
SRR2885591	SRR2885591	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	blastema de extremidad	blastema distal de la extremidad	adulto	no determinado	no determinado	no determinado	no determinado
SRR2885592	SRR2885592	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	codo	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885593	SRR2885593	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	codo	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885594	SRR2885594	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	brazo anterior	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885595	SRR2885595	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	brazo anterior	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885596	SRR2885596	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	filamento branquial	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885597	SRR2885597	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	mano	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885598	SRR2885598	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	mano	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885599	SRR2885599	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	mano	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885600	SRR2885600	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	corazón	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR2885601	SRR2885601	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	corazón	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885675	SRR2885675	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	no extremidad	corazón	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885865	SRR2885865	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	blastema de extremidad	blastema proximal de la extremidad	adulto	no determinado	no determinado	no determinado	no determinado
SRR2885866	SRR2885866	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	blastema de extremidad	blastema proximal de la extremidad	adulto	no determinado	no determinado	no determinado	no determinado
SRR2885867	SRR2885867	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	músculo esquelético	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885868	SRR2885868	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	músculo esquelético	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885869	SRR2885869	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	músculo esquelético	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885870	SRR2885870	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	músculo esquelético	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885871	SRR2885871	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	brazo superior	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885873	SRR2885873	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	brazo superior	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR2885875	SRR2885875	PRJ-NA300706	D. M. Bryant, Johnson <i>et al.</i> (2017)	extremidad	brazo superior	subadulto	no determinado	no aplicable	no determinado	no determinado
SRR5042765	SRR5042765	PRJ-NA354434	Caballero-Pérez <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	cola	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR5042766	SRR5042766	PRJ-NA354434	Caballero-Pérez <i>et al.</i> (2018)	extremidad	extremidad anterior	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado
SRR5042767	SRR5042767	PRJ-NA354434	Caballero-Pérez <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	hígado	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado
SRR5042768	SRR5042768	PRJ-NA354434	Caballero-Pérez <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	branquias	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado
SRR5042769	SRR5042769	PRJ-NA354434	Caballero-Pérez <i>et al.</i> (2018)	extremidad	extremidad posterior	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado
SRR5042770	SRR5042770	PRJ-NA354434	Caballero-Pérez <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	corazón	adulto	no determinado	no aplicable	hembra	no determinado
SRR5341564	SRR5341564	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	ovarios	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341565	SRR5341565	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	islotos	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341568	SRR5341568	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	Intact spinal cord	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341569	SRR5341569	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	testículos	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341570	SRR5341570	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	bazo	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341571	SRR5341571	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	pulmón	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341572	SRR5341572	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	hígado	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341573	SRR5341573	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	corazón	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341574	SRR5341574	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	cerebro	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341575	SRR5341575	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	cabeza	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)

Continúa en la siguiente página...

Cuadro B.1 – continúa desde la página anterior

Identificador de muestra (ID)	SRR (NCBI)	GSE ID o BioProject (NCBI)	Lote	Grupo de tejido	Tejido	Grupo de edad	Edad (días)	Días posamputación (dpa)	Sexo	Cepa/genotipo
SRR5341576	SRR5341576	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	blastema de extremidad	blastema de la extremidad anterior	adulto	no determinado	15	no determinado	white (d/d)
SRR5341577	SRR5341577	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	blastema de extremidad	blastema de la extremidad anterior	adulto	no determinado	9	no determinado	white (d/d)
SRR5341578	SRR5341578	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	blastema de la cola	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341579	SRR5341579	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	médula espinal lesionada	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341580	SRR5341580	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	médula espinal lesionada	adulto	no determinado	no aplicable	no determinado	white (d/d)
SRR5341581	SRR5341581	PRJ-NA378982	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)	no extremidad	brote de la cola	subadulto	5	no aplicable	no determinado	white (d/d)

C. Generación y anotación de una librería de elementos repetitivos del genoma de *Ambystoma mexicanum*

Se generó *de novo* una biblioteca de elementos repetitivos del genoma del ajolote (AmexG_v6.0-DD) para su uso en trabajos futuros. Todos los procedimientos descritos a continuación y el código para la generación de la biblioteca de elementos repetitivos se encuentran detallados en el siguiente repositorio de GitHub: https://github.com/samuelruizperez/axoloTE_RElibrary.

Se identificaron y modelaron *de novo* los elementos repetitivos del genoma del ajolote (AmexG_v6.0-DD; Nowoshilow *et al.*, 2018) empleando RepeatModeler 2.0.4 contenido en el Dfam TE Tools Container 1.7 (Dfam Consortium, 2022). Este contenedor se modificó para incluir sus paquetes en las siguientes versiones (**Cuadro C.1**):

Cuadro C.1. Lista de paquetes contenidos en versión modificada de Dfam TE Tools Container 1.7.

Paquete bioinformático	Versión	URL	Referencia
RepeatModeler	2.0.4	http://www.repeatmasker.org/RepeatModeler/	Flynn <i>et al.</i> (2020)
RepeatMasker	4.1.4	http://www.repeatmasker.org/RMDownload.html	Smit <i>et al.</i> (2013)
coseg	0.2.2	http://www.repeatmasker.org/COSEGDownload.html	Smit <i>et al.</i> (2013)
RMblast	2.13.0	http://www.repeatmasker.org/RMblast.html	Smit <i>et al.</i> (2013)
HMMER	3.3.2	http://hmmer.org/	«HMMER 3.3.2» (2020)

Continúa en la siguiente página...

Cuadro C.1 – continúa desde la página anterior

Paquete bioinformático	Versión	URL	Referencia
TRF	4.09.1	https://github.com/Benson-Genomics-Lab/TRF	Benson (1999)
RepeatScout	1.0.6	http://www.repeatmasker.org/RepeatScout-1.0.6.tar.gz	Price <i>et al.</i> (2005)
RECON	1.08	http://www.repeatmasker.org/RepeatModeler/RECON-1.08.tar.gz	Bao y Eddy (2002)
cd-hit	4.8.1	https://github.com/weizhongli/cdhit	Li y Godzik (2006) y Fu <i>et al.</i> (2012)
genometools	1.6.3 (df1df94)	https://github.com/genometools/genometools	Gremme <i>et al.</i> (2013)
LTR_retriever	2.9.0	https://github.com/oushujun/LTR_retriever/	Ou y Jiang (2018)
MAFFT	7.471	https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/	Katoh y Standley (2013)
NINJA	0.97-cluster only	https://github.com/TravisWheelerLab/NINJA	Wheeler <i>et al.</i> (2024)
UCSC utilities (faToTwoBit, twoBitInfo, twoBitToFa)	v413	http://hgdownload.soe.ucsc.edu/admin/exe/	Kent <i>et al.</i> (2002)

La biblioteca de elementos repetitivos que resultó del modelado con RepeatModeler2 fue subida a la base de datos Dfam (<https://www.dfam.org/>), la cual es una colección abierta de aline-

mientos de secuencias de DNA de elementos transponibles, modelos ocultos de Markov (HMM), secuencias consenso y anotaciones genómicas (Storer *et al.*, 2021).

En el **Cuadro C.2** se presenta un resumen de las estadísticas de las ejecuciones de RepeatModeler2 con varios genomas de muestra y el genoma del ajolote. Para el caso del genoma de referencia del ajolote (AmexG_v6.0-DD), el porcentaje de muestreo fue mayor en el presente trabajo que en el modelado hecho por Nowoshilow *et al.* (2018). A su vez, se modelaron 27403 subfamilias de elementos repetitivos, a diferencia de las 2956 familias reportadas por Nowoshilow *et al.* (2018). Sin embargo, es importante destacar que las subfamilias reportadas por Nowoshilow *et al.* (2018) fueron curadas y agrupadas manualmente tras la ejecución de RepeatModeler2, lo que podría explicar el menor número de subfamilias. Por otro lado, solo la biblioteca modelada en este trabajo está disponible en Dfam, lo que garantiza su acceso y uso libre por parte de la comunidad científica.

Cuadro C.2. Comparación de resultados y estadísticas para ejecuciones de RepeatModeler2 con varios genomas de muestra y el genoma del ajolote.

Genoma	Tamaño del genoma (bp)	Porcentaje de muestreo del genoma con RepeatModeler2	Tiempo de ejecución (hh:mm) de RepeatModeler2	Modelos (subfamilias) de construidos	Biblioteca disponible en Dfam	Referencia
<i>D. melanogaster</i>	164 Mbp	-	12:56	734	Sí	Flynn <i>et al.</i> (2020)
<i>D. rerio</i>	1.4 Gbp	-	40:36	3851	Sí	Flynn <i>et al.</i> (2020)
<i>O. sativa</i>	375 Mbp	-	37:23	2648	Sí	Flynn <i>et al.</i> (2020)

Continúa en la siguiente página...

Cuadro C.2 – continúa desde la página anterior

Genoma	Tamaño del genoma (bp)	Porcentaje de muestreo del genoma con RepeatModeler2	Tiempo de ejecución (hh:mm) de RepeatModeler2	Modelos (subfamilias) de construidos	Biblioteca disponible en Dfam	Referencia
<i>A. mexicanum</i> (Nowoshilow <i>et al.</i> , 2018)	32 Gbp	≈1.5 %	-	2956	No	Nowoshilow <i>et al.</i> (2018)
<i>A. mexicanum</i> (Nowoshilow <i>et al.</i> , 2018)	32 Gbp	4.29 %	>856:00 (>1 mes)	27403	Sí	Este trabajo

Posteriormente, con base en los protocolos detallados en Goubert *et al.* (2022), se realizó una curación manual de los resultados de la predicción de elementos repetitivos. Finalmente, con RepeatMasker se enmascararon los elementos repetitivos de la biblioteca en el genoma de referencia del ajolote. La biblioteca, archivos de anotación y demás información suplementaria están disponibles en el siguiente repositorio de Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.11088877>.

Referencias

- Bao, Z., y Eddy, S. R. (2002). Automated de novo identification of repeat sequence families in sequenced genomes. *Genome Research*, 12(8), 1269-1276. <https://doi.org/10.1101/gr.88502>
- Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 573-580. <https://doi.org/10.1093/nar/27.2.573>
- Dfam Consortium. (2022). *Dfam TE Tools Container* (Ver. 1.7). Consultado el 26 de abril de 2023, desde <https://github.com/Dfam-consortium/TETools/tree/1.7>

- Flynn, J. M., Hubley, R., Goubert, C., Rosen, J., Clark, A. G., Feschotte, C., y Smit, A. F. (2020). RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable element families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9451-9457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921046117>
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., y Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150-3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Goubert, C., Craig, R. J., Bilal, A. F., Peona, V., Vogan, A. A., y Protasio, A. V. (2022). A beginner's guide to manual curation of transposable elements. *Mobile DNA*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13100-021-00259-7>
- Gremme, G., Steinbiss, S., y Kurtz, S. (2013). GenomeTools: A Comprehensive Software Library for Efficient Processing of Structured Genome Annotations. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 10(3), 645-656. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2013.68>
- HMMER 3.3.2. (2020, 26 de noviembre). Consultado el 4 de octubre de 2023, desde <http://hmmer.org/>
- Katoh, K., y Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., y Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Research*, 12(6), 996-1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
- Li, W., y Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(13), 1658-1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- 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., Falcon, F., Knapp, D., Powell, S., Cruz, A., Cao, H., Habermann, B., Hiller, M., Tanaka, E. M., y Myers, E. W. (2018). The axolotl genome and

- the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, 554(7690), 50-55. <https://doi.org/10.1038/nature25458>
- Ou, S., y Jiang, N. (2018). LTR_retriever: A Highly Accurate and Sensitive Program for Identification of Long Terminal Repeat Retrotransposons. *Plant Physiology*, 176(2), 1410-1422. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01310>
- Price, A. L., Jones, N. C., y Pevzner, P. A. (2005). De novo identification of repeat families in large genomes. *Bioinformatics*, 21, i351-i358. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1018>
- Smit, A. F. A., Hubley, R., y Green, P. (2013). *RepeatMasker Open-4.0*. <http://www.repeatmasker.org>
- Storer, J., Hubley, R., Rosen, J., Wheeler, T. J., y Smit, A. F. (2021). The Dfam community resource of transposable element families, sequence models, and genome annotations. *Mobile DNA*, 12(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13100-020-00230-y>
- Wheeler, T., Wan Der Maas Soares, M., y Lesica, G. (2024, 15 de febrero). *TravisWheelerLab/NINJA*. Wheeler Lab. Consultado el 23 de abril de 2024, desde <https://github.com/TravisWheelerLab/NINJA>

D. Resumen de los genes y elementos repetitivos con el mayor cambio en la regeneración y el envejecimiento

Cuadro D.1. Lista de los genes y elementos repetitivos con la mayor tasa de cambio absoluta significativa para los contrastes del blastema vs. la extremidad y las muestras de adultos vs. subadultos.

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
IL11	AMEX60DD016524	8.85	.	8.35	16
ODAM	AMEX60DD044102	7.95	.	5.42	16
AMEX60DD044091	AMEX60DD044091	6.97	.	5.66	15
SHF_dup2	AMEX60DDU001031218	6.11	3.39	3.7	16
MMP13_dup7	AMEX60DD049502	5.82	4.76	4.37	16
AMEX60DD015912	AMEX60DD015912	5.76	15
KAZALD1_dup4	AMEX60DD046684	5.7	7.05	.	.	-2.69	.	.	5
SHD	AMEX60DD014280	5.53	5.26	4.05	16
KAZALD1_dup3	AMEX60DD046379	5.52	6.91	.	.	-2.28	.	.	5
BHLHA9	AMEX60DD054790	5.47	.	41.29	.	23.28	-12.62	-37.07	16
AMEX60DDU001021321	AMEX60DDU001021321	5.41
GSG1	AMEX60DD054043	5.41	.	2.65	15
TAPBPL_dup1	AMEX60DD015913	5.36	.	6.11	15
MMP11	AMEX60DD000336	5.34	4.87	4.61	16
ANGPTL2_dup1	AMEX60DD031854	5.28	6.69	3.57	16
.	rnd-6_family-8458:rnd-6_family-8458:Desconocido	2.52	.	3.08	.	.	.	-5.15	14
.	rnd-5_family-1610:rnd-5_family-1610:Desconocido	-2.07	14
.	5000_5500_cluster_433:Mag:Ty3:LTR	-2.27	14
.	6000_6500_cluster_342:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	-2.31	14

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
.	5500_6000_cluster_5043:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	-2.64	.	.	.	2.43	.	.	14
.	rnd-5_family-3873:rnd-5_family-3873:Desconocido	-2.68	14
AMEX60DD018562	AMEX60DD018562	-4.29	.	-28.18	.	4.63	29.32	23.56	15
.	6000_6500_cluster_793:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	-4.58	.	-3.71	14
NNMT_dup23	AMEX60DD053668	-5.01	.	-9.91	4.29	.	.	4.99	9
SMPD3_dup1	AMEX60DD015439	-5.4	-2.99	-4.52	-4.69	.	.	.	15
NNMT_dup21	AMEX60DD053666	-6.4	-8.25	-8.87	3.32	.	.	.	6
AMEX60DD032486	AMEX60DD032486	-6.41	.	-37.76	.	.	40.45	41.78	16
PRSS35	AMEX60DD033732	-6.54	.	-7.26	-2.34	-4.15	3.59	8.37	6
SRPK3_dup3	AMEX60DD023209	-8.62	.	-8.55	-4.65	-3.7	.	5.41	6
SYPL2	AMEX60DD009200	-11.37	6
AMEX60DD051962	AMEX60DD051962	-11.47	6
ACTC1_dup5	AMEX60DD034544	-11.48	-4.11	-15.11	.	-6.02	.	6.92	6
MYL1	AMEX60DD055382	-11.64	.	-13.77	.	-3.47	.	6.76	6
PVALB_dup2	AMEX60DD025873	-11.66	-3.57	-17.58	.	-8.19	.	9.62	6
MYL3	AMEX60DD020542	-11.67	.	-13.34	.	-2.6	.	4.13	6
TNNT3	AMEX60DD004521	-11.73	.	-13.71	.	-3.53	.	5.96	6
PVALB_dup3	AMEX60DD029312	-11.74	-6.89	-14.93	.	-4.91	.	.	6
MYBPC1_dup1	AMEX60DD008355	-11.84	-3.7	-13.4	.	-3.06	.	4.31	6
SLN	AMEX60DD049438	-11.93	6
KLHL41	AMEX60DD055633	-12.01	.	-14.54	.	-3.05	.	7.51	6
MYL2	AMEX60DD000676	-12.24	.	-13.76	.	-2.41	6.52	9.92	6
CKM	AMEX60DD024851	-12.26	.	-14.81	.	-4.62	.	8.92	6
CASQ1	AMEX60DD016918	-12.68	-4.86	-16.71	.	-6.57	.	7.17	6
TNNC1_dup1	AMEX60DD023145	-12.85	.	-16.35	.	-4.59	.	11.68	6
BIRC5_dup1	AMEX60DD029442	.	31.98	-14.1	.	-19.34	23.67	44.87	7

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
LOC115401458_dup5	AMEX60DD023365	.	30.62	.	.	-24.63	.	40.8	15
AMEX60DD013551	AMEX60DD013551	.	29.66	-9.86	.	-26.03	12.92	39.99	.
AMEX60DD002927	AMEX60DD002927	.	29.07	-3.89	.	-29.9	.	36.6	16
AMEX60DD022853	AMEX60DD022853	.	28.21	.	.	-29.08	.	.	.
MDY_dup2	AMEX60DD019625	.	28.03	-11.94	.	-24.2	14.79	39.36	15
BMP2_dup1	AMEX60DD014649	.	27.96	13.64	15
AK8_dup7	AMEX60DDU001011696	.	27.26	10.7	.	-26.46	-9.82	15.92	15
AMEX60DD028188	AMEX60DD028188	.	27.08	.	.	-11.91	.	26.72	7
AMEX60DDU001042006	AMEX60DDU001042006	.	26.92	-14.14	.	-23.82	16.41	40.34	15
AMEX60DD046052	AMEX60DD046052	.	26.12	20.9	.	9	8.15	.	7
AMEX60DD006712	AMEX60DD006712	.	25.07	4.88	.	.	14.26	.	16
AMEX60DDU001026322	AMEX60DDU001026322	.	24.97	.	.	-14.47	13.83	31.67	7
GLIPR1_dup2	AMEX60DD011558	.	24.92	17.62	.	21.08	24.65	.	15
AMEX60DD024156	AMEX60DD024156	.	24.5	.	.	-23.9	.	34.17	.
MSGN1	AMEX60DD033138	.	23.38	-15.79	.	-22.09	14.36	37.81	.
NOX1_dup1	AMEX60DD034979	.	23.03	-11.48	.	-26.59	.	34.08	15
AMEX60DD028310	AMEX60DD028310	.	22.64	-12.99	.	-24.18	.	35.05	7
AMEX60DDU001004810	AMEX60DDU001004810	.	18.64	-16.32	.	-7	21.04	34.79	7
AMEX60DD022698	AMEX60DD022698	.	17.61	-20.06	.	-11.47	22.88	36.46	15
AMEX60DDU001033535	AMEX60DDU001033535	.	17.37	-18.43	.	-23.62	.	34.64	.
LOC115074190	AMEX60DD053952	.	15.52	-11.42	.	-27.18	.	27.11	8
CRYGB_dup52	AMEX60DD055132	.	12.16	26.55	.	12.02	.	-10.25	11
CRYGB_dup53	AMEX60DD055133	.	5.93	-24.18	.	.	29.34	32.68	11
HBZ_dup5	AMEX60DD021537	.	4.19	.	-7.19	-10.36	.	.	5
HAO1	AMEX60DD035727	.	3.71	-30.18	.	.	32.76	37.19	9
COL11A1_dup1	AMEX60DD018809	.	3.26	.	-3.27	-7.32	.	5.19	6
HMG2_dup3	AMEX60DD055769	.	2.92	.	-3.79	.	.	.	1
.	9500_10000_cluster_33:Epsilon:LTR	.	2.41	2.6	4

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
.	4500_5000_cluster_320:Mag:Ty3:LTR	.	-1.92	14
.	5500_6000_cluster_1447:Gmr1:Metaviridae:Ty3:LTR	.	-2.01	14
.	6500_7000_cluster_458:Gmr1:Metaviridae:Ty3:LTR	.	-2.02	.	.	2.06	.	.	14
.	7000_7500_cluster_172:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-2.07	.	.	2.2	.	.	14
.	4500_5000_cluster_89:Mag:Ty3:LTR	.	-2.1	14
.	6500_7000_cluster_937:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-2.11	14
.	rnd-6_family-949:hAT-Charlie:DNA	.	-2.12	.	.	2.29	.	.	14
.	5750_6250_cluster_32:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-2.14	.	.	1.84	.	.	14
.	6500_7000_cluster_301:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-2.14	14
.	7000_7500_cluster_1172:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-2.15	.	.	2.33	.	.	14
.	rnd-5_family-243:Ty3:LTR	.	-2.16	.	.	2.2	.	.	14
.	4750_5250_cluster_637:Mag:Ty3:LTR	.	-2.16	14
.	4750_5250_cluster_417:Mag:Ty3:LTR	.	-2.17	15
.	rnd-4_family-2002:rnd-4_family-2002:Desconocido	.	-2.18	14
.	5250_5750_cluster_569:Mag:Ty3:LTR	.	-2.34	.	.	4.79	.	.	14
ZNF665_dup2	AMEX60DD036497	.	-2.34	.	2.47	3.37	.	.	15
.	6000_6500_cluster_381:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-2.63	.	.	5.24	.	.	14
.	5250_5750_cluster_1413:Mag:Ty3:LTR	.	-2.75	.	.	5.79	.	.	14
.	4750_5250_cluster_705:Mag:Ty3:LTR	.	-2.87	.	.	5.09	.	.	14

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
.	5250_5750_cluster_795:Mag:Ty3:LTR	.	-2.99	.	.	5.23	.	.	14
.	5000_5500_cluster_949:Mag:Ty3:LTR	.	-3.11	.	.	4.6	.	.	14
DMBT1_dup18	AMEX60DD053301	.	-3.22	.	4.62	.	.	.	16
.	6250_6750_cluster_458:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-3.32	.	.	4.88	.	.	14
.	rnd-4_family-513:rnd-4_family-513:Desconocido	.	-3.68	.	.	3.66	.	-3.56	14
.	6250_6750_cluster_5805:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-3.74	.	.	3.59	.	.	14
.	5500_6000_cluster_358:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-3.77	.	.	2.48	.	.	14
.	rnd-5_family-2140:rnd-5_family-2140:Desconocido	.	-3.79	.	.	2.72	.	-3.94	13
.	rnd-4_family-2576:rnd-4_family-2576:Desconocido	.	-3.86	.	.	3.21	.	-4.33	13
.	7750_8250_cluster_73:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-3.86	.	.	6.78	.	.	14
.	5250_5750_cluster_1260:Mag:Ty3:LTR	.	-3.88	.	.	4.91	.	.	14
.	5250_5750_cluster_1953:Mag:Ty3:LTR	.	-4.05	.	.	5.93	.	.	14
.	5000_5500_cluster_2832:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-4.14	.	.	2.78	.	.	14
.	6250_6750_cluster_5211:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-4.19	.	.	3.36	.	.	14
.	6500_7000_cluster_583:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-4.44	.	.	5.83	.	.	14
.	6500_7000_cluster_1196:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-4.47	.	.	2.58	.	.	14
.	6000_6500_cluster_330:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-4.62	.	.	2.49	.	.	14

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
.	6250_6750_cluster_214:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	.	-4.64	.	.	4.84	.	.	14
.	15500_16000_cluster_287:Spu-ma:LTR	.	-4.65	.	.	2.49	.	-3.39	13
LRRC52_dup1	AMEX60DD018171	.	-5.52	22.9	.	7.68	-21.75	-30.39	15
.	rnd-4_family-751:PIF-Harbinger:DNA	.	-5.84	.	.	4.79	.	.	14
LRP2BP	AMEX60DD045401	.	-5.99	21.29	.	6.41	-21.4	-28.61	15
C3ORF84	AMEX60DD023276	.	-6.31	24.87	.	10.78	-21.46	-33.36	15
AMEX60DD054827	AMEX60DD054827	.	-7.64	22.22	.	9.58	-21.14	-32.93	15
XE-LAEV_18033243MG_dup1	AMEX60DD009277	.	-8.63	38.47	.	36.98	.	-50.78	15
ASNSD1_dup1	AMEX60DD053068	.	-9.04	22.25	.	8.15	-22.64	-34.15	15
AMEX60DD048030	AMEX60DD048030	.	-9.23	32.37	.	32.48	.	-45.51	15
PINLYP_dup4	AMEX60DD017942	.	-11.2	27.69	.	22.32	-16.66	-39.27	16
AMEX60DD048031	AMEX60DD048031	.	-11.21	33.51	.	33.44	.	-46.93	15
LOC115460466_dup1	AMEX60DD040663	.	-12.06	21.28	.	8.3	-23.78	-33.32	15
PDILT_dup1	AMEX60DD020632	.	-16.42	28.92	.	15.55	-25.66	-44.04	2
H2BC1_dup1	AMEX60DD039090	.	-18.44	16.97	.	8.06	-21.77	-34.23	15
AMEX60DD021147	AMEX60DD021147	.	-19.64	34	.	27.1	-24.13	-51.6	15
AMEX60DD038200	AMEX60DD038200	.	-21.32	21.26	.	12.54	-27.06	-41.33	15
AMEX60DD025770	AMEX60DD025770	.	-21.42	34.52	.	25.12	-26.13	-52.28	.
AMEX60DD034961	AMEX60DD034961	.	-29.81	.	.	37.77	.	-29.25	15
AMEX60DD001931	AMEX60DD001931	.	-31.07	.	.	36.93	.	-31.2	15
CRYGB_dup1	AMEX60DD055074	.	-31.32	-49.87	.	-13.2	.	18.07	11
PARPI_0007353_dup4	AMEX60DD045851	.	-34.96	.	.	36.81	.	-32.45	15
AMEX60DD047123	AMEX60DD047123	.	-35.57	.	.	39.42	.	-35.71	15
AMEX60DD005174	AMEX60DD005174	.	-37.24	.	.	38.99	.	-31.79	15
AMEX60DD024759	AMEX60DD024759	.	-38.37	.	.	38.09	.	-34.68	15
AMEX60DD035823	AMEX60DD035823	.	-38.48	.	.	41.32	.	-36.98	15

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
AMEX60DD024680	AMEX60DD024680	.	-40.03	.	.	36.99	.	-34.88	15
AMEX60DD001541	AMEX60DD001541	.	-41.86	-52.28	.	-13.83	.	.	9
AMEX60DD028361	AMEX60DD028361	.	-42.12	.	.	37.1	.	-36.73	15
KRT17_dup5	AMEX60DD010113	.	-42.34	-49.07	.	-12.28	.	.	16
AMEX60DD043969	AMEX60DD043969	.	-43.43	.	.	38.19	.	-38.41	15
AMEX60DD043110	AMEX60DD043110	.	-43.54	.	.	38.35	.	-39.31	15
ARHGAP11A	AMEX60DD024406	.	-43.95	.	.	37.25	.	-34.65	7
AMEX60DD026365	AMEX60DD026365	.	-43.95	.	.	37.7	.	-5.82	15
APOB_dup2	AMEX60DD033071	.	-45.42	-47.44	9
AMEX60DD001540	AMEX60DD001540	.	-46.02	-53.95	.	-12.87	.	.	9
AMEX60DD017665	AMEX60DD017665	.	-46.4	.	.	29.03	-15.27	-46.05	15
SYCP2_dup1	AMEX60DD027234	.	-46.56	.	.	30.33	.	-44.14	15
AMEX60DD051247	AMEX60DD051247	.	-47.14	-46.86	.	-11.58	.	.	16
AMEX60DDU001008137	AMEX60DDU001008137	.	-47.35	-54.77	.	-8.12	.	.	16
AMEX60DD009802	AMEX60DD009802	.	-47.82	-50.4	.	-10.95	.	.	9
AMEX60DD004863	AMEX60DD004863	.	-47.84	.	.	27.27	-6.29	-44.06	15
AMEX60DD001474	AMEX60DD001474	.	-48.2	-51.07	.	-11.7	.	.	9
PRODH2	AMEX60DD028422	.	-48.27	-50.87	.	-10.26	.	.	9
AMEX60DD028239	AMEX60DD028239	.	-48.6	.	.	29.88	-18.92	-48.81	15
DDX4_dup2	AMEX60DD042140	.	-49.05	.	.	24.69	-19.45	-45.28	15
FERD3L	AMEX60DD022294	.	-49.3	.	.	30.61	-16.34	-47.45	7
PKHD1_dup4	AMEX60DD032854	.	-49.64	-46.69	15
ZNF569_dup5	AMEX60DD046640	.	-49.9	.	.	41.22	.	-44.29	15
LOC115370421_dup24	AMEX60DDU001002085	.	-51.17	-58.03	.	-9.43	.	.	.
PRSS2_dup7	AMEX60DD026419	.	-51.2	-47.37	16
AB205_0134110_dup5	AMEX60DD031292	.	-51.6	-47.94	10
TESMIN	AMEX60DD004327	.	-52.05	.	.	30.27	-17.75	-48.39	15
LOC114566488	AMEX60DD032647	.	-52.28	-47.34	16

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
LOC106704584	AMEX60DD008943	.	-59.38	-20.95	.	10.33	-21.44	-35.2	15
AMEX60DD002091	AMEX60DD002091	.	-60.04	-17.68	.	12.54	-25.94	-40.3	15
AMEX60DD021008	AMEX60DD021008	.	-60.92	.	.	31.19	-7.02	-46.15	15
AMEX60DD043684	AMEX60DD043684	.	-61.08	-23.86	.	10.85	-23.42	-35.73	15
CYP2A6_dup1	AMEX60DD008880	.	-61.12	-30.69	.	4.91	-22.97	-29.56	15
AMEX60DD007060	AMEX60DD007060	.	-62.16	-36.19	.	6.22	.	.	15
AMEX60DD006634	AMEX60DD006634	.	-62.23	-36.34	.	11.05	.	-22.77	15
AMEX60DDU001034099	AMEX60DDU001034099	.	-62.23	-25.93	.	11.94	-11.09	-32.23	15
AMEX60DD001525	AMEX60DD001525	.	-62.27	-36.67	.	10.97	.	-22.75	15
LOC115110228	AMEX60DDU001008847	.	-62.29	-38.26	.	4.23	.	-5.53	15
LOC107983852	AMEX60DD037393	.	-62.35	-34.93	.	13.49	.	-24.92	15
RGSL2	AMEX60DD018628	.	-62.36	-35.4	.	10.01	.	-19.09	15
AMEX60DD043691	AMEX60DD043691	.	-62.41	-31.3	.	11.84	.	-26.84	15
AMEX60DD011134	AMEX60DD011134	.	-62.46	-37.24	.	10.85	.	-23.17	15
LOC112544977	AMEX60DD025382	.	-62.51	-36.94	.	9.49	.	-11.96	15
AMEX60DD007613	AMEX60DD007613	.	-62.64	-34.3	.	7.76	.	-12.62	15
AMEX60DD047423	AMEX60DD047423	.	-62.69	-35.23	15
FSIP2_dup6	AMEX60DD038128	.	-62.86	-35.51	.	12.7	.	-25.13	15
ACRBP_dup3	AMEX60DD026880	.	-63.02	-36.14	.	8.92	.	-12.76	15
AMEX60DD052457	AMEX60DD052457	.	-63.11	-35.35	.	10.8	.	-21.38	15
AMEX60DD050544	AMEX60DD050544	.	.	49.96	.	33.46	-17.51	-50.8	15
AMEX60DD029513	AMEX60DD029513	.	.	42.97	.	27.57	-16.07	-43.62	15
AMEX60DDU001002634	AMEX60DDU001002634	.	.	40.48	.	29.6	.	-42.31	.
AMEX60DD027647	AMEX60DD027647	.	.	32.24	.	19.15	.	-43.99	15
UCP3_dup1	AMEX60DD044953	.	.	28.34	.	15.03	.	-21.85	16
AMEX60DD055330	AMEX60DD055330	.	.	27.03	15
.	5500_6000_cluster_1305:Mag:Ty3:LTR	.	.	-2.3	14

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
.	rnd-6_family-3091:PIF-Harbinger:DNA	.	.	-2.66	14
.	5000_5500_cluster_761:Mag:Ty3:LTR	.	.	-2.87	14
LOC115370421_dup16	AMEX60DD033021	.	.	-3.33	6.44	.	.	.	6
AMEX60DD008872	AMEX60DD008872	.	.	-15.6	.	-25.16	.	37.8	.
AMEX60DD040488	AMEX60DD040488	.	.	-17.95	.	15.11	26.97	5.04	15
AMEX60DD015402	AMEX60DD015402	.	.	-18.66	.	13.15	26.64	9.81	15
AMEX60DD031750	AMEX60DD031750	.	.	-21.27	.	-27.91	.	31.74	1
DNAH10_dup5	AMEX60DD047854	.	.	-21.33	.	11.22	26.67	10.44	15
MYO3A	AMEX60DD021881	.	.	-21.74	.	.	27.3	23.9	15
ROPN1	AMEX60DD056080	.	.	-21.94	.	10.82	26.52	13.58	15
AMEX60DDU001029113	AMEX60DDU001029113	.	.	-23.08	.	-30.2	-11.76	.	9
AMEX60DD038766	AMEX60DD038766	.	.	-23.41	.	6.84	28.53	21.05	15
AMEX60DD028716	AMEX60DD028716	.	.	-24.72	.	3.48	29.45	24.32	16
D9C73_028124_dup20	AMEX60DD017949	.	.	-29.24	.	.	29.52	32.17	1
REG1B_dup1	AMEX60DD009608	.	.	-29.46	.	.	27.61	28.05	16
LOC105357518_dup27	AMEX60DD025840	.	.	-30.13	.	.	28.04	29.4	14
AMEX60DD012488	AMEX60DD012488	.	.	-30.14	.	.	27.48	27.23	16
AMEX60DD027324	AMEX60DD027324	.	.	-39.34	.	-14.48	23.34	39.28	16
ORF2_dup6	AMEX60DD020567	.	.	.	6.65	.	.	.	1
ZNF501_dup4	AMEX60DD046387	.	.	.	4.34	2.07	.	.	16
FAM134C_dup2	AMEX60DD048066	.	.	.	3.55	.	.	.	16
CKAP2	AMEX60DD049130	.	.	.	-2.19	3.31	.	.	15
COL1A2	AMEX60DD022398	.	.	.	-2.32	-3.33	.	.	5
COL1A1	AMEX60DD009937	.	.	.	-3.45	-4.28	.	.	5
PAFAH2	AMEX60DD005745	.	.	.	-3.78	-1.6	.	.	5
GIMAP7_dup2	AMEX60DD026538	.	.	.	-4.62	.	.	.	16
BTBD8	AMEX60DD019134	.	.	.	-5.5	.	.	.	15

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el IHW-adj $p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
CCDC127_dup2	AMEX60DD036788	.	.	.	-5.52	.	.	.	16
ROHU_026682_dup11	AMEX60DD051665	.	.	.	-5.76	.	.	.	16
CYP2A6_dup7	AMEX60DD008899	.	.	.	-6.59	-2.53	.	.	16
CYP2A6_dup6	AMEX60DD008898	.	.	.	-7.11	-7.06	.	.	1
LOC115082697_dup1	AMEX60DD002115	.	.	.	-7.13	-4.23	.	.	1
LOC105357518_dup13	AMEX60DD009875	.	.	.	-7.26	.	.	.	16
LOC111947684_dup15	AMEX60DD039476	.	.	.	-7.48	-2.64	.	.	6
PI3_dup2	AMEX60DD032519	.	.	.	-12.19	.	.	.	15
AMEX60DD028198	AMEX60DD028198	.	.	.	-21.67	.	.	.	16
LY6E_dup7	AMEX60DD041072	.	.	.	-23.03	-9.85	.	.	1
.	6750_7250_cluster_869:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	5.36	.	.	15
.	5000_5500_cluster_764:Mag:Ty3:LTR	4.78	.	.	15
.	6500_7000_cluster_2240:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	1.8	.	.	14
.	5250_5750_cluster_801:Mag:Ty3:LTR	1.8	.	.	14
.	rnd-6_family-1981:rnd-6_family-1981:Desconocido	1.8	.	.	14
.	12500_13000_cluster_666:Spuma:LTR	1.8	.	.	14
.	7000_7500_cluster_284:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	1.8	.	.	14
.	rnd-5_family-1643:Ty3:LTR	1.79	.	.	14
.	5250_5750_cluster_554:Mag:Ty3:LTR	1.77	.	.	14
.	6750_7250_cluster_168:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	1.77	.	.	14
.	rnd-6_family-6602:rnd-6_family-6602:Desconocido	1.77	.	.	14

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

Continúa en la siguiente página...

Cuadro D.1 – continúa desde la página anterior

Símbolo del gen o elemento repetitivo	Identificador del gen o elemento repetitivo	B vs. L	B vs. L (A)	B vs. L (SA)	A vs. SA	A vs. SA (L)	A vs. SA (B)	Efecto de la edad (B vs. L)	Módulo en WGCNA (Figura 6.18)
.	6750_7250_cluster_667:Gmr1:Metaviridae:Ty3:LTR	1.75	.	.	14
.	rnd-5_family-1980:rnd-5_family-1980:Desconocido	1.74	.	.	14
.	rnd-5_family-1875:rnd-5_family-1875:Desconocido	1.73	.	.	14
.	rnd-5_family-397:rnd-5_family-397:Desconocido	1.71	.	.	14
.	6000_6500_cluster_1929:Vclade:Chromoviridae:Ty3:LTR	1.69	.	.	14
.	5000_5500_cluster_845:Mag:Ty3:LTR	1.69	.	.	14
SLC6A3_dup6	AMEX60DDU001011716	-25.27	.	.	.
.	10250_10750_cluster_497:Epsilon:LTR	2.91	14

SA: subadulto, A: adulto, L: extremidad, B: blastema de extremidad. Los valores corresponden al $\text{ash-log}_2(\text{FC})$, cuando el $\text{IHW-adj } p < 0.05$.

E. Publicación de artículos durante la licenciatura

E.1. Retrotransposon expression is upregulated by aging and suppressed during regeneration of the limb in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) (Ruiz-Pérez *et al.*, 2024 [Prepublicación])

- Título:** Retrotransposon expression is upregulated by aging and suppressed during regeneration of the limb in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*)
- Autores:** Samuel Ruiz-Pérez, Karla Torres-Arciga, Cynthia Gabriela Sámano-Salazar, José Antonio Ocampo-Cervantes, Alejandra Cervera, Clementina Castro-Hernández, Ernesto Soto-Reyes, Nicolas Alcaraz, Rodrigo González-Barrios
- Abstract** The axolotl (*Ambystoma mexicanum*) has a great capacity to regenerate its tissues and whole-body parts; however, the fidelity and success of its regenerative process diminish with age. Retrotransposons make up the largest portion of the axolotl genome, and their expression may be involved in this age-related decline. Through an integrative analysis of repetitive element expression using RNA-seq, we show that Ty3 retrotransposons are highly upregulated in the axolotl as an effect of chronological aging. Other non-LTR transposons, including LINE-1, function as hubs of gene coexpression networks involved in muscle development, N-methyltransferase activity, amyloid proteolysis, and regulation of apoptosis and connective tissue replacement, which are also suppressed by the increase in age. In contrast, we find that during regeneration of the limb these pathways and the expression of Ty3 retrotransposons are distinctly downregulated. Although the blastema is able to readjust most of the transposon dysregulation caused by aging, there are still several elements that remain affected and may have an impact in the metabolic and immune responses during the regenerative process. We also report that numerous C2H2-ZFPs, especially KRAB-ZFPs, are coexpressed with hub retrotransposons, which reveals their potential as important regulators of transposable element expression during aging and regeneration. This integrative analysis provides a comprehensive profile of retrotransposon expression through chronological aging and during limb regeneration in the axolotl and indicates that transposable elements are responsive to physiological changes in a tissue-specific way and participate in the gene co-regulatory networks underlying the regenerative process.
- Fecha:** 2024-04-08
- Repositorio:** bioRxiv
- section:** New Results
- DOI:** <https://doi.org/10.1101/2024.04.04.588033>
- Derechos:** © 2024 The Authors. Posted by Cold Spring Harbor Laboratory.
- Licencia:** Creative Commons Attribution 4.0 International

E.2. Histones and their chaperones: Adaptive remodelers of an ever-changing chromatinic landscape (Torres-Arciga *et al.*, 2022)

Tipo de artículo:	Artículo de revisión
Título:	Histones and their chaperones: Adaptive remodelers of an ever-changing chromatinic landscape
Autores:	Karla Torres-Arciga, Manuel Flores-León, Samuel Ruiz-Pérez , Magalli Trujillo-Pineda, Rodrigo González-Barrios, Luis A. Herrera
Abstract	Chromatin maintenance and remodeling are processes that take place alongside DNA repair, replication, or transcription to ensure the survival and adaptability of a cell. The environment and the needs of the cell dictate how chromatin is remodeled; particularly where and which histones are deposited, thus changing the canonical histone array to regulate chromatin structure and gene expression. Chromatin is highly dynamic, and histone variants and their chaperones play a crucial role in maintaining the epigenetic regulation at different genomic regions. Despite the large number of histone variants reported to date, studies on their roles in physiological processes and pathologies are emerging but continue to be scarce. Here, we present recent advances in the research on histone variants and their chaperones, with a focus on their importance in molecular mechanisms such as replication, transcription, and DNA damage repair. Additionally, we discuss the emerging role they have in transposable element regulation, aging, and chromatin remodeling syndromes. Finally, we describe currently used methods and their limitations in the study of these proteins and highlight the importance of improving the experimental approaches to further understand this epigenetic machinery.
Fecha:	2022-11-16
Título corto:	Histones and their chaperones
Publicación:	Frontiers in Genetics
Volumen:	13
Páginas:	1057846
ISSN:	1664-8021
DOI:	https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1057846
Derechos:	© 2022 The Authors.
Licencia:	Creative Commons Attribution 4.0 International

E.3. Equine Hoof Wall Deformation: Novel Aspects Revealed (Lazarus *et al.*, 2023)

Tipo de artículo:	Artículo de investigación original
Título:	Equine Hoof Wall Deformation: Novel Aspects Revealed
Autores:	Benjamin S. Lazarus, Rachel K. Luu, Samuel Ruiz-Pérez , Josiane D. V. Barbosa, Iwona Jasiuk, Marc A. Meyers
Abstract	<p>The equine hoof wall has a unique hierarchical structure that allows it to survive high-impact scenarios. Previous authors have explored the compressive, viscoelastic, and fracture control properties of the hoof wall and suggested that this complex structure plays a vital role in the hoof's behavior. However, the link between the structure and the behavior of the hoof wall has been made primarily with the use of post-fracture analysis. Here, periodic microcomputed tomography scans are used to observe the temporal behavior of the hoof's meso and microstructures during compression, fracture, and relaxation. These results shed light on the structural anisotropy of the hoof wall and how its hollow tubules behave when compressed in different directions, at different hydration levels, and in various locations within the hoof wall. The behavior of tubule bridges during compression is also reported for the first time. This study elucidates several fracture phenomena, including the way cracks are deflected at tubule interfaces and tubule bridging, tubule arresting, and fiber bridging. Finally, relaxation tests are used to show how the tubule cavities can regain their shape after compression.</p>
Fecha:	2023-05-01
Título corto:	Equine Hoof Wall Deformation
Publicación:	Small Structures
Volumen:	4
Número:	10
Páginas:	2200402
ISSN:	2688-4062
DOI:	https://doi.org/10.1002/sstr.202200402
Derechos:	© 2023 The Authors. Small Structures published by Wiley-VCH GmbH
Licencia:	Creative Commons Attribution 4.0 International

E.4. Jackfruit: Composition, structure, and progressive collapsibility in the largest fruit on the Earth for impact resistance (Lazarus *et al.*, 2023)

Tipo de artículo:	Artículo de investigación original
Título:	Jackfruit: Composition, structure, and progressive collapsibility in the largest fruit on the Earth for impact resistance
Autores:	Benjamin S. Lazarus, Victor Leung, Rachel K. Luu, Matthew T. Wong, Samuel Ruiz-Pérez , Willams T. Barbosa, Wendell B. Almeida Bezerra, Josiane D. V. Barbosa, Marc A. Meyers
Abstract	<p>The jackfruit is the largest fruit on the Earth, reaching upwards of 35 kg and falling from heights of 25 m. To survive such high energy impacts, it has evolved a unique layered configuration with a thorny exterior and porous tubular underlayer. During compression, these layers exhibit a progressive collapse mechanism where the tubules are first to deform, followed by the thorny exterior, and finally the mesocarp layer in between. The thorns are composed of lignified bundles which run longitudinally from the base of the thorn to the tip and are embedded in softer parenchymal cells, forming a fiber reinforced composite. The mesocarp contains more lignin than any of the other layers while the core appears to contain more pectin giving rise to variations in compressive and viscoelastic properties between the layers. The surface thorns provide a compelling impact-resistant feature for bioinspiration, with a cellular structure that can withstand large deformation without failing and wavy surface features which densify during compression without fracturing. Even the conical shape of the thorns is valuable, presenting a gradually increasing surface area during axial collapse. A simplified model of this mechanism is put forward to describe the force response of these features. The thorns also distribute damage laterally during impact and deflect cracks along their interstitial valleys. These phenomena were observed in 3D printed, jackfruit-inspired designs which performed markedly better than control prints with the same mass.</p>
Fecha:	2023-08-01
Publicación:	Acta Biomaterialia
Volumen:	166
Páginas:	430-446
ISSN:	1742-7061
DOI:	https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.04.040
Derechos:	© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Acta Materialia Inc.
Licencia:	Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International

E.5. Equine hoof wall: Structure, properties, and bioinspired designs (Lazarus *et al.*, 2022)

Tipo de artículo:	Artículo de investigación original
Título:	Equine hoof wall: Structure, properties, and bioinspired designs
Autores:	Benjamin S. Lazarus, Rachel K. Luu, Samuel Ruiz-Pérez , Wendell Bruno Almeida Bezerra, Kevin Becerra-Santamaria, Victor Leung, Victor Hugo Lopez Durazo, Iwona Jasiuk, Josiane D. V. Barbosa, Marc A. Meyers
Abstract	<p>The horse hoof wall exhibits exceptional impact resistance and fracture control due to its unique hierarchical structure which contains tubular, lamellar, and gradient configurations. In this study, structural characterization of the hoof wall was performed revealing features previously unknown. Prominent among them are tubule bridges, which are imaged and quantified. The hydration-dependent viscoelasticity of the hoof wall is described by a simplified Maxwell-Weichert model with two characteristic relaxation times corresponding to nanoscale and mesoscale features. Creep and relaxation tests reveal that the specific hydration gradient in the hoof keratin likely leads to reduced internal stresses that arise from spatial stiffness variations. To better understand realistic impact modes for the hoof wall in-vivo, drop tower tests were executed on hoof wall samples. Fractography revealed that the hoof wall's reinforced tubular structure dominates at lower impact energies, while the intertubular lamellae are dominant at higher impact energies. Broken fibers were observed on the surface of the tubules after failure, suggesting that the physically intertwined nature of the tubule reinforcement and intertubular matrix improves the toughness of this natural fiber reinforced composite. The augmented understanding of the structure-mechanical property relationship in dynamic loading led to the design of additively manufactured bioinspired structures, which were evaluated in quasistatic and dynamic loadings. The inclusion of gradient structures and lamellae significantly reduced the damage sustained in drop tower tests, while tubules increased the energy absorption of samples tested in compact tension. The samples most similar to the hoof wall displayed remarkably consistent fracture control properties.</p>
Fecha:	2022-10-01
Publicación:	Acta Biomaterialia
Volumen:	151
Páginas:	426-445
ISSN:	1742-7061
DOI:	https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.08.028
Derechos:	© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Acta Materialia Inc.
Licencia:	Creative Commons Attribution 4.0 International