



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA REGENERACIÓN
CEREBRAL DEL AJOLOTE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Arturo Emiliano Martínez Hernández

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dra. Susana Castro Obregón
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dr. Jesús Chimal Monroy
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Junio, 2022



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.

Agradecimientos Institucionales

El Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez este proyecto que se trabajó en el Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología de la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que participó durante el desarrollo de este proyecto estuvo integrado por:

Dra. Susana Castro Obregón Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Jesús Chimal Monroy. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se extiende un agradecimiento a la Dra. Itzel Escobedo Ávila por su apoyo en el desarrollo experimental de este trabajo. También al M en C. Emmanuel Ríos Castro de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, LaNSE del CINVESTAV-IPN. Al Dr. Turan Demircan de la Universidad de Mugla en Turquía por colaborar en el desarrollo bioinformático de este proyecto. A la Dra. Raquel Cuevas Díaz Durán de la Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey por su tutoría y colaboración en la programación de código en el análisis bioinformático de este proyecto. Finalmente a Alonso Ortega Gurrola por continuar trabajando en este proyecto a la distancia y asesorarme técnicamente.

Este proyecto fue apoyado por las becas CONACyT 265793 y 765049 y el presuesto PAPIIT-UNAM IN213719.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Medicina regenerativa	2
2.2 El Ajolote Mexicano (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	4
2.3 Regeneración de extremidades en <i>Ambystoma mexicanum</i>	5
2.4 Regeneración de la médula espinal en <i>Ambystoma mexicanum</i>	7
2.5 Regeneración cerebral en <i>Ambystoma mexicanum</i>	9
2.6 El genoma del ajolote.....	13
2.7 Regulación de la regeneración vía miRNAs.....	14
3. ANTECEDENTES	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos particulares.....	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1 Procesamiento de miRNAs.....	19
6.2 Procesamiento de muestras de proteínas	20
7. RESULTADOS	22
7.1 Análisis de miRNAs diferencialmente expresados	22
7.2 Análisis de expresión diferencial de proteínas	29
7.3 Relación de los miRNAs y proteínas diferencialmente expresados.....	34
8. DISCUSIÓN	36
8.1 Diferencias entre los perfiles de expresión entre transcritos (mRNAs) y proteínas	37
8.2 Papel de los miRNAs diferencialmente expresados	38
8.3 miRNAs previamente reportados en la regeneración del ajolote	40
8.4 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas	42
8.4 Integración de la correspondencia miRNA- Proteína diferencialmente expresados	46
9. CONCLUSIONES	47
10. PERSPECTIVAS	48
11. REFERENCIAS	50
12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	60

1. RESUMEN

El ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) es uno de los pocos animales que existen en la naturaleza que están dotados con la capacidad de regenerar estructuras perdidas como como branquias, extremidades, cola y en particular el cerebro. En la actualidad se desconoce qué es lo que permite a este animal contar con esta capacidad. Sin embargo, esta característica puede estar oculta dentro de su genoma que es 10 veces más grande que el de los humanos, por lo que estudios con aproximaciones *ómicas* permitirán identificar moléculas reguladoras de esta capacidad que puedan ser, en última instancia, llevadas a un modelo de mamífero para evaluar si la regeneración es inducible en ellos.

En el presente estudio se propuso evaluar los cambios en el perfil de expresión de micro RNAs (miRNAs) y proteínas que acontecen dentro de las 6 primeras horas luego de una lesión mecánica en el cerebro del ajolote. Esto se realizó a través del análisis bioinformático de datos de secuenciación de miRNAs y de espectrometría de masas de proteínas aisladas del palio dorsal del telencéfalo lesionado, donde se realizó una extracción mecánica de una porción de un milímetro de tejido.

Se encontraron 32 miRNAs diferencialmente expresados entre las distintas condiciones temporales comparadas contra un animal control. Luego de una revisión de la literatura en mamíferos, se identificó que una gran proporción de estos miRNAs son descritos como “onco-miRNAs”. Esto es, que participan en el establecimiento y desarrollo de distintos tipos de cáncer por mecanismos de división celular aberrante, inhibición de genes supresores de tumores, entre otros. Por otro lado, también se encontraron 171 proteínas diferencialmente expresadas entre las distintas condiciones comparadas con el control. A través de análisis de ontología genética se relacionaron a estas proteínas con procesos de estabilización del citoesqueleto, remodelamiento de la matriz extracelular, adhesión celular, entre otros. Se hipotetiza que, en conjunto, estos perfiles de expresión están fijando un ambiente celular que precede y es necesario para el proceso de regeneración.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Medicina regenerativa

La medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar órganos, tejidos o células humanas que hayan sido dañadas, estén enfermas o metabólicamente deficientes por conducto de ingeniería de tejidos, cultivos celulares, terapia génica, entre otros (Mao & Mooney, 2015). Surge como una necesidad de buscar nuevos diagnósticos y abordajes terapéuticos a problemas de salud pública que ocurren con alta frecuencia, pues según la Organización Mundial de la Salud, padecimientos como: diabetes mellitus, cáncer pulmonar, infecciones respiratorias, cardiopatías isquémicas, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, además de accidentes viales, son de alarmante prevalencia mundial al estar dentro de las 10 causas de muertes más frecuentes, ya que dieron cuenta del 55% de los decesos ocurridos en 2019 (*The Top 10 Causes of Death*, 2019).

Dentro de las formas clásicas en las que se ha abordado la medicina regenerativa existen modelos de cultivo celular que involucran crecer tejidos u órganos de forma *in vitro* para una posterior implantación o trasplante al organismo; estas técnicas también involucran la posibilidad de evaluar fármacos *in vitro*, así como generar cultivos *ex vivo* para corregir afectaciones paciente-específicas (Mao & Mooney, 2015); dentro de este rubro se pueden ubicar a las células troncales. Las células troncales embrionarias (ESC) y células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) comparten la característica de **pluripotencia**, es decir, la capacidad de diferenciarse a tejido de cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo además de **auto-renovación** (Kolios & Moodley, 2013). La diferencias entre ellas radica en que las ESC provienen de la masa interna del blastocisto (una etapa del desarrollo previa a la implantación del embrión) 5 a 7 días después de la fertilización en humanos, mientras que las iPSC fueron descritas por Takahashi y Yamanaka en 2006, cuando a través de la trasducción viral de 4 factores de transcripción -*Sox2*, *Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4*- (llamados factores de Yamanaka) a un cultivo de fibroblastos de ratón (células somáticas) lograron que estas células adquirieran un estado de pluripotencia similar al de las ESC (K. Takahashi & Yamanaka, 2006); un año después, el mismo grupo publicó la

reprogramación al estado pluripotencial de fibroblastos humanos (K. Takahashi et al., 2007). Desde entonces las células troncales abrieron la posibilidad de generar diversos tipos celulares, ya sea sanguíneos, musculares, neuronales, etc. para terapia regenerativa. Estas células se podrían generar de manera paciente-específica, lo cual descartaría los problemas actuales de los trasplantes como son la inmunocompatibilidad o la disponibilidad de los mismos (Schweitzer et al., 2020). Por ejemplo, durante la década de los noventa se realizaron trasplantes de tejido de la zona ventral del mesencéfalo de fetos humanos -rico en neuroblastos- a dos pacientes con enfermedad de Parkinson, con el fin de repoblar neuronas dopaminérgicas perdidas de la vía *nigroestriatal*, obteniendo que estas células tuvieron un efecto terapéutico al recuperar la estabilidad motora e incluso detener el tratamiento farmacológico con *levodopa*, además de que este efecto fue sostenido hasta por 15 años (Kefalopoulou et al., 2014). Por otro lado, en 2018 se realizó el primer trasplante de neuronas dopaminérgicas *CORIN*⁺ generadas a partir de una línea celular de iPSCs con gran inmunocompatibilidad a pacientes con enfermedad de Parkinson, cuyas evaluaciones aún no han sido reportadas, pero que sin duda se orientan a retrasar la etapa avanzada de la enfermedad más que mejorar la sintomatología severa (J. Takahashi, 2020).

Como otra alternativa, las terapias basadas en la biología molecular involucran la inducción de la regeneración *in situ* a través de administrar moléculas bioactivas, vehículos para la edición génica, etc. en sitios afectados con la intención de recuperar la función previa del sitio blanco (Hsu et al., 2019).

Una aproximación más reciente a la medicina regenerativa implica evaluar los modelos de regeneración natural *in vivo*. Animales como el pez cebra (*Danio rerio*), la rana africana (*Xenopus laevis*), el ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) o el tritón (*Notophthalmus viridescens*) llevan a cabo procesos de regeneración epimórfica sobre tejidos adultos que han sido lesionados y que desencadenan respuestas globales que culminan en la restitución de estructuras parcial o totalmente perdidas (Sandoval-Guzmán & Currie, 2018). A manera de ejemplo, ha sido descrito un gel de alginato enriquecido con nanopartículas de pectina cargadas con una lipoxigenasa -enzima involucrada en la respuesta inflamatoria de una herida- extraída del ajolote que acorta el tiempo de sanado de una herida y la re-

epitelización en la piel de ratas lesionadas, además de que el cerrado de la herida se acortó y disminuyó la incidencia de cicatrización aberrante (Oveissi et al., 2020). Con lo anterior se demostró que el estudio de la naturaleza regenerativa de ciertas especies permite elucidar, e integrar los elementos regulatorios de dicha capacidad en mamíferos, esperando que éstos puedan en un futuro regenerar órganos estructural y funcionalmente complejos (Satoh et al., 2010).

2.2 El Ajolote Mexicano (*Ambystoma mexicanum*)

El ajolote es una salamandra de la familia *Urodeale* que puede pasar su vida entera en un estado juvenil o **neoténico**, manteniendo la morfología larval incluso al volverse un adulto reproductivo (Voss et al., 2009). Bajo condiciones naturales, los ajolotes pueden permanecer su vida entera sin atravesar un proceso de metamorfosis, usando principalmente sus branquias para obtener oxígeno y prefiriendo entornos acuáticos. Sin embargo, se puede inducir su metamorfosis administrándoles hormona tiroidea (T₄) que provocará la regresión de sus rasgos larvales, que serán sustituidos por rasgos de un adulto terrestre (Johnson, 2013) como los del tritón (*N. viridescens*).

La habilidad de reparar lesiones y heridas superficiales está conservada entre todos los organismos. Sin embargo, el ajolote mexicano es capaz de regenerar órganos como: corazón, pulmones, hígado, médula espinal, cerebro, así como las extremidades, quijada y branquias (Vieira et al., 2019). Esta regeneración ocurre sin dejar alguna cicatriz o forma aberrante del tejido y con la completa restauración de la función original. Sin embargo, la capacidad regenerativa merma con el tiempo, pues se ve ligeramente disminuida con la edad del ejemplar (Mccusker & Gardiner, 2011) y si el mismo ha atravesado por metamorfosis; en el último caso, la regeneración pierde fidelidad al tejido original (por ejemplo, la falta de dígitos en extremidades) (Farkas & Monaghan, 2015) (Monaghan et al., 2014). También, se ha demostrado que la amputación constante del mismo miembro luego de una serie de ciclos regenerativos en animales neoténicos genera miniaturización y denervación del sitio, truncando en última instancia el desarrollo de una nueva extremidad dejando un muñón a consecuencia de fibrosis aberrante que altera la morfología del epitelio de la zona afectada y su capacidad de regeneración (Bryant et al., 2017).

2.3 Regeneración de extremidades en *Ambystoma mexicanum*

La respuesta regenerativa –reproducción precisa de las estructuras perdidas– comienza inmediatamente después de la amputación con hemostasia (prevención de la pérdida de sangre por mecanismos de coagulación) y una rápida re-epitelización llevada a cabo por queratinocitos que cubren los nervios truncados, promovida por el rápido remodelamiento de la matriz extracelular (Monaghan et al., 2007). Consecutivamente se forma una multicapa llamada ***cobertura apical epitelial*** (AEC, por sus siglas en inglés), cuya función radica en proveer al sitio lesionado de señales moleculares necesarias para la regeneración, por medio de su actividad secretora de fibronectina, de señalización nerviosa y de regionalización próximo-distal, entre otros (Londono et al., 2018).

Posteriormente, por debajo de la AEC se acumula una población de células mesenquimales indiferenciadas en el sitio de la amputación llamada ***blastema***, el cual es formado mediante distintos procesos, como: el re-ingreso al ciclo celular de células troncales adultas residentes y su migración (Johnson et al., 2018), transdiferenciación y dediferenciación de células adyacentes –mecanismo considerado central en la regeneración epimórfica (Yokoyama, 2007)–. La dediferenciación involucra la pérdida del estado diferenciado (identidad funcional) de las células de los tejidos adyacentes al daño, para volver a un estado similar al del desarrollo embrionario con capacidades multipotentes, se ha reportado que esto ocurre principalmente en fibroblastos (Sato et al., 2010). De manera simultánea, ocurren cambios en la matriz extracelular provocados por macrófagos y metaloproteasas (matrix metalloproteases: *MMPs*) que activan la migración y plasticidad celular (Sandoval-Guzmán & Currie, 2018) en el sitio de la amputación. Por otro lado, se ha reportado que el re-ingreso al ciclo celular no sólo ocurre en respuesta en la región adyacente donde ocurrió el daño, sino que es independiente de las estructuras locales y actúa incluso a nivel del miembro contralateral y de algunos órganos, sugiriendo un efecto sistémico, señalizado a través de mTor, que promueve a las células troncales quiescentes lejanas al sitio de lesión a renovarse y migrar hacia el blastema (Johnson et al., 2018).

Es importante destacar que sin innervación de los nervios truncados no hay formación de AEC ni de blastema, truncando la regeneración (C. H. Wu et al., 2013). Se ha encontrado que los nervios de los miembros amputados actúan liberando factores mitogénicos como *Ndbgf* (nerve-derived blastema growth factor), que promueve la proliferación de células en el blastema y conduce la morfogénesis del miembro amputado (Boilly & Albert, 1988). Respecto a las células troncales adultas se tiene reporte de que, en el caso del tritón (*N. viridescens*), hay una contribución de miofibras desdiferenciadas en la regeneración de un nuevo miembro, cosa que no ocurre en el ajolote mexicano; éste regenera fibras musculares vía células troncales satélite *Pax7*⁺ (Sandoval-Guzmán et al., 2014). Es por conducto de estos mecanismos que el blastema establece un microambiente que favorece la atracción de factores de regeneración como: factor de crecimiento de fibroblastos (*Fgfs*; por sus siglas en inglés), proteínas morfogénicas del hueso (*Bmps*; por sus siglas en inglés) y Sonic Hedgehog (*Shh*) que continúan el crecimiento, diferenciación y morfogénesis que eventualmente culminarán en la formación de un miembro exactamente igual al anterior con la misma funcionalidad (Tanaka, 2016).

La expresión de genes como el retrotransposon *Line-1* (long interspersed nucleotide element-1), *Pl1* y *Pl2* (Piwi-like 1 y 2) –que juegan un rol en la regeneración de miembros, proliferación y supervivencia del blastema- señala una reutilización de genes involucrados en procesos germinales y del desarrollo embrionario, que hasta el momento de la lesión había estado apagados (Zhu, Pao, et al., 2012)(Zhu, Kuo, et al., 2012). Se ha señalado que la ganancia de funciones regenerativas a través de los procesos descritos anteriormente de desdiferenciación, reprogramación, transdiferenciación y migración de células troncales se hacen por conducto de una re-adquisición del potencial celular presente en el desarrollo embrionario. Sin embargo, el estado “desdiferenciado” durante la regeneración en el ajolote no es un regreso total al estado de pluripotencia con el que cuentan las ESC, si no que es más parecido a una multipotencia transitoria que involucra al tejido adyacente al daño, aunado a la retención de la información posicional o la memoria del tejido que juegan un papel fundamental en proveer la señalización necesaria para activar la regeneración (Albors et al., 2015; Mchedlishvili et al., 2007).

2.4 Regeneración de la médula espinal en *Ambystoma mexicanum*

La habilidad regenerativa del ajolote en lesiones de médula espinal (SCI, *spinal cord injury*) se ha estudiado a través de dos modelos: el primero se establece en la amputación de la cola y la regeneración de una nueva; el segundo, mediante la transección de una región intermedia de la médula espinal, donde habrá un hueco que se reconectará y regenerará a partir de los extremos rostrales y caudales lesionados (Tazaki et al., 2017). La población celular involucrada en la regeneración del fragmento faltante de cola es la glía radial que reviste el canal central de la médula espinal. La glía radial se encargará de proliferar y posteriormente diferenciar precursores neurales (Amamoto et al., 2016) para regenerar una nueva cola o un fragmento de médula amputado.

Esta población endodermal (ependimoglia) está enriquecida con células troncales neurales (NSC) positivas para el marcador de pluripotencia *Sox2* y para el marcador de glía *Gfap* (glial fibrillary acidic protein). A través de un proceso de proliferación de la endodimoglia en el sitio del corte, se logra el cierre de la herida e inicia el crecimiento de la estructura tubular del canal endodermal donde a lo largo de su extensión hay proliferación para auto renovarse por hasta dos semanas; finalmente, ocurrirá diferenciación de la zona rostral a la caudal que repoblarán los distintos tipos de neuronas y glía (Mchedlishvili et al., 2012). Además, se dirige la regeneración de tejidos adyacentes a la médula espinal por conducto de los morfógenos que caracterizan el patrón antero-posterior, sentado por los genes *Hox* (Homeobox genes) y el patrón dorso-ventral de la endodimoglia *-Pax7* (Paired box 7) en la zona dorsal, *Pax6* (Paired box 6) en la zona lateral y *Shh* en la zona ventral- (A. X. Sun et al., 2018) (Christen et al., 2003). Sonic Hedgehog (*Shh*) encontrado en la placa del piso en la zona ventral en la médula espinal madura y en regeneración, estimula la formación del cartílago por debajo de la médula espinal para formar las vértebras y estructuras óseas pertenecientes a la somitas. Adicionalmente, en caso de amputación se identificó que la población endodermal en una zona adyacente de 0.5mm al lugar de corte, es la encargada de dirigir la regeneración hacia el extremo caudal sin que haya migración celular de la zona rostral anterior a este punto, sugiriendo que el evento regenerativo se lleva a cabo a través de proliferación celular más que por migración de precursores (Mchedlishvili et al., 2007) en

este paradigma de lesión. La memoria del tejido, o particularmente, la identidad posicional del tejido capaz de regenerarse se ve involucrada en los tiempos inmediatos posteriores a una lesión de médula espinal (SCI), reconociendo el sitio de la lesión y organizando el blastema (Sehm et al., 2009). Por ejemplo, al trasplantar un blastema de cola en una posición distinta al sitio de lesión original sobre el eje antero-posterior, el injerto se extiende hasta tener el tamaño de cola correspondiente a su posición original y no al del nuevo hospedero.

Las células endimogliales podrían estar afectadas por la edad, produciendo menos factores neurotróficos y mitogénicos (Vieira et al., 2019), pues se demostró que extractos de médula espinal de ajolotes viejos causan una respuesta proliferativa disminuida en cultivos *in vitro* de blastema, en comparación con extractos de un ajolote juvenil que estimulan una rápida proliferación y maduración del blastema (Boilly & Albert, 1988), lo que vuelve a evidenciar la importancia de la estimulación nerviosa en la regeneración de la médula espinal y extremidades.

Es de interés el estudio de lesiones en la médula espinal del ajolote, ya que su entendimiento podría identificar elementos regulatorios que pudieran ser trasladados a un modelo humano con fines regenerativos, recordando que un principal obstáculo para lograr dicho objetivo es la formación de una *cicatriz glial* en lugares lesionados del sistema nervioso central (SNC) en humanos. La cicatriz glial se define como la acumulación de astrocitos reactivos, glía NG2 y microglía en la región periférica al sitio afectado por una lesión. Es importante mencionar que esta cicatriz se forma en diversas formas de lesión además de SCI, como: traumatismo cerebral, infarto isquémico, tumores cerebrales, neuroinflamación crónica y enfermedades neurodegenerativas (H. Wang et al., 2018). Las poblaciones presentes en la cicatriz glial son heterogéneas, e incluso un mismo grupo de glía funciona distinto en una forma de lesión que en otra, por ejemplo: los astrocitos A1 presentes en un modelo de neuroinflamación promueven muerte de neuronas y oligodendocitos, mientras que los mismos astrocitos A1 en un modelo de isquemia fomentan la expresión de factores neurotróficos (Factor inhibidor de leucemia *Lif*, trombospondinas, citosinas) y transferencia mitocondrial a neuronas dañadas que fomentan la supervivencia de las neuronas. Por otra parte, la microglía M1 ha sido señalada como pro-inflamatoria y con respuesta reactiva tóxica

secretando interleucina-1alfa, factor de necrosis tumoral (*Tnf*) y el componente del complemento C1q, mientras que la M2 es anti-inflamatoria y promueve la diferenciación de oligodendrocitos (Adams & Gallo, 2018). Se le atribuye a la cicatriz glial una cualidad inhibitoria de la regeneración axonal en el modelo de SCI en humanos, causada por la secreción de proteoglicanos, factores asociados a mielina (myelin associated factors MAFs) y colágenos (Hui et al., 2013), atravesando por un proceso de *dieback* caracterizado por la retracción de las fibras axonales de los somas celulares, formando bulbos distróficos en los extremos afectados y perdiendo las habilidades motoras y sensoriales del extremo de la lesión donde permanecieron las prolongaciones axonales. Sin embargo, su formación previene un daño mayor de la médula espinal, estabilizando el tejido dañado del SNC (Diaz Quiroz et al., 2014). Es de destacarse el hecho que, en modelos de SCI en ajolotes, los factores asociados a mielina (MAFs) son permisivos para el desarrollo y regeneración del SNC del ajolote, cosa que no ocurre en los humanos.

2.5 Regeneración cerebral en *Ambystoma mexicanum*

En mamíferos, la neurogénesis adulta está restringida a dos zonas cerebrales: la zona subventricular (SVZ) del telencéfalo y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo. Las NSC de la SVZ siguen una ruta que comienza con su proliferación (células B, GFAP⁺), posterior generación de células amplificadoras transitorias (células C), mismas que se diferencian a neuroblastos (células A) y finalmente a neuronas maduras (Grandel & Brand, 2013). En mamíferos como el mono y los ratones, las células A migran a través de la corriente migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio, donde se diferencian a interneuronas GABAérgicas y/o neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, en humanos no se ha identificado neurogénesis en el bulbo olfatorio, sino en la región adyacente a la SVZ, el estriado (Bergmann et al., 2012; Ernst et al., 2014). En el caso de la SGZ, las células tipo 1 son las NSC que se caracterizan por ser *Gfap*⁺ y *Sox2*⁺, entre otros. Las células tipo 2 son los progenitores intermedios que generan las células tipo 3 o neuroblastos. Estas nuevas neuronas se unen a la circuitería preexistente en el hipocampo. Cabe destacar que el evento neurogénico en el giro dentado disminuye gradualmente durante la infancia de los seres humanos hasta ser nulo antes de los 10 años (Sorrells et al., 2018).

Por el contrario, los ajolotes son capaces de añadir nuevas neuronas en un estado homeostático a lo largo de su vida en la mayoría de las zonas del cerebro y en caso de lesiones mecánicas, pueden regenerar hasta un tercio de masa cerebral de un hemisferio (Amamoto et al., 2016). Esto se debe a que, así como hay un recubrimiento del canal central de la espina dorsal del ajolote con células endimogliales con potencial neurogénico, también la hay en la zona radial de los ventrículos cerebrales (Fig. 1).

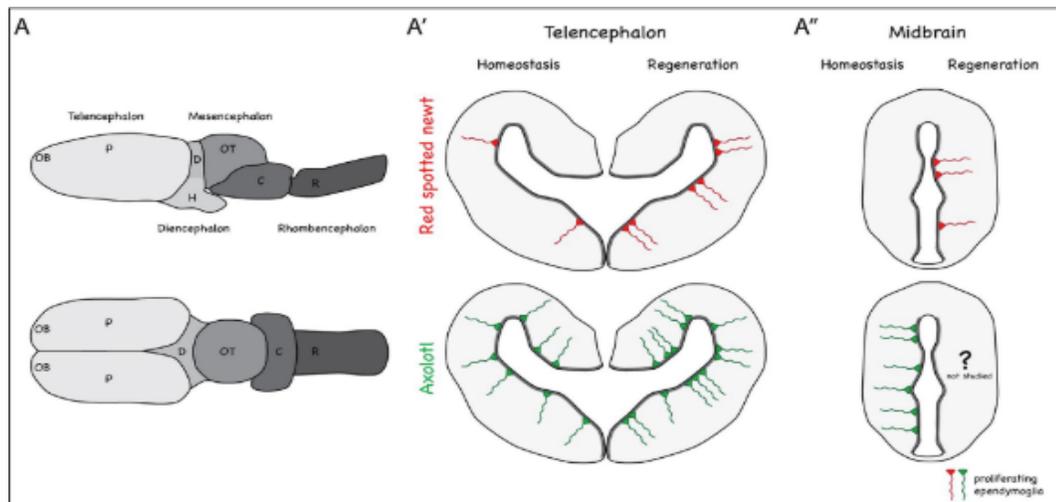


Figura 1. A) Anatomía del cerebro del tritón (Red spotted Newt) y del ajolote (axolotl), A') Regiones del telencéfalo donde se encuentra la endimoglia proliferativa en verde para el ajolote y rojo para el tritón, A'') Regiones del mesencéfalo donde se encuentra la endimoglia proliferativa. En el ventrículo izquierdo de las figuras A' y A'' se encuentra en proporción la cantidad de endimoglia proliferativa con respecto del lado derecho en un estado de regeneración. Figura extraída de (Sabin et al., 2019).

La endimoglia se encuentra situada alineada a la superficie apical cerebral, cuyos somas están localizados en los ventrículos, formando un conglomerado celular que es conocido como la capa endimoglia; la endimoglia de dicha capa está compuesta por largos procesos radiales que envuelven los vasos sanguíneos y siguen extendiéndose hacia la superficie pial; otra función de la endimoglia es absorber metabolitos del fluido cerebroespinal y proveerlo a las neuronas (Joven & Simon, 2018). La endimoglia cerebral expresa marcadores de NSC como son *Sox2*, *Musashi-1 (Msi1)* en el cuerpo celular y el marcador de astrocitos *Gfap* en los procesos radiales (Urata et al., 2018).

En experimentos realizados en el tritón (*N. viridescens*) se encontró que la endimoglia que reviste las cavidades ventriculares del telencéfalo está distribuida en sitios discretos (*hot spots*) proliferativos y que puede clasificarse en dos tipos de sub poblaciones: la **tipo 1** es una población, en general, quiescente con progenitores que se dividen lentamente, expresa glutamina sintasa (*Gs*), *Gfap* y *Notch1*; por otro lado la **tipo 2** es altamente proliferativa y genera progenie que se divide rápidamente y expresa únicamente *Gfap*. A través de ensayos con AraC (arabinosido de citosina) para matar a las células con una mayor tasa de proliferación, se encontró que la endimoglia tipo 2 tiene características de células amplificadoras transitorias (TACs, por sus siglas en inglés), mientras que la tipo 1 tiene propiedades de células troncales (Kirkham et al., 2014).

Aunado a lo anterior, en un experimento realizado por Maden y colaboradores en 2013, se identificó usando marcaje con bromodeoxiuridina (BrdU), que la endimoglia de la zona ventricular migra hacia la parénquima o capa neural en un periodo de 2 semanas. Luego de este tiempo, la endimoglia comienza a diferenciarse generando neuronas maduras que expresan *NeuN*, o bien *Dcx* en neuronas inmaduras; cabe destacar que el ajolote está dotado de capacidad proliferativa de NSC en estado homeostático en todo su cerebro, aunque el telencéfalo es la porción cerebral en la que más frecuentemente ocurre neurogénesis en dicho estado. Este mismo grupo también encontró que al remover una porción de telencéfalo dorsal, éste se regenera a los 40 días, además de que el tiempo de regeneración disminuye si se daña el nervio olfatorio, ya que éste debe reconectarse primero para dar paso a la regeneración. Nuevamente se destaca el papel fundamental de la innervación para la correcta reconstrucción del tejido dañado (Maden et al., 2013). Otra gran contribución a la regeneración cerebral del ajolote la hizo el grupo de Amamoto y colaboradores en 2016. Ellos experimentaron retirando una porción de palio dorsal de telencéfalo y observando las dinámicas de regeneración a lo largo de un proceso de 11 semanas. Descubrieron que el cerrado de la herida ocurre de 2 a 4 semanas luego de la lesión por un proceso de remodelamiento del tejido previo a la proliferación celular; a partir de las 4 semanas hay acumulación de células proliferativas -endimoglia- que precede a la diferenciación neuronal. Finalmente destacan que en el periodo entre las 4 y 11 semanas después de la lesión ocurre la diferenciación neuronal. Es importante señalar que, así como

hay una respuesta proliferativa en la zona adyacente al daño en telencéfalo, también la hay en regiones más distales -telencéfalo rostral- que contribuyen a generación de neuronas.

También identificaron a través de inmunohistoquímica una gran variedad de subpoblaciones neuronales en el telencéfalo del ajolote y señalaron que luego de una lesión mecánica a este sitio, el ajolote es capaz de regenerar las mismas subpoblaciones de una manera indistinguible al control, además de que el tejido restaurado tiene actividad electrofisiológica igual a la de un ejemplar no lesionado. Sin embargo, este grupo encontró algunas limitaciones en la capacidad regenerativa en el cerebro del ajolote, pues la nuevas neuronas se distribuyeron en regiones donde normalmente no se agrupan, causando alteraciones en la arquitectura del tejido a comparación de la vesícula contralateral. Además las fibras axonales regeneradas no se reconectan a sus blancos cuando estos se encuentran a una larga distancia, como es el caso de bulbo olfatorio (Fig. 2) (Amamoto et al., 2016).

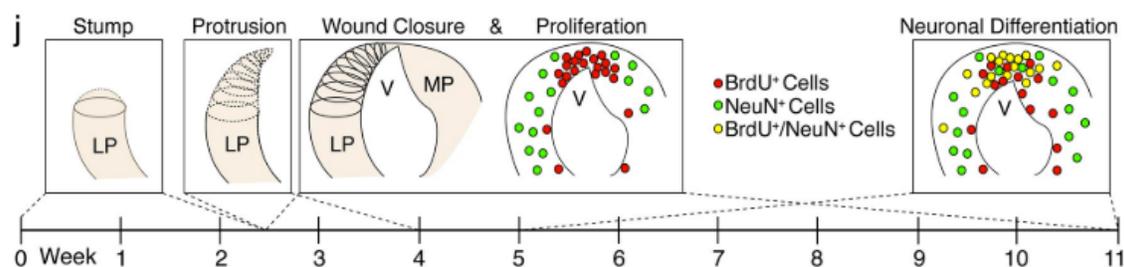


Figura 2. Proceso de regeneración del palio dorsal del telencéfalo del ajolote luego de daño mecánico. De izquierda a derecha se muestra la formación de un muñón sobre el palio lateral 2 semanas después de la lesión (dl) que se extenderá hacia el palio medial cerrando la herida aproximadamente 4 semanas dl, seguido por evento de proliferación de ependimoglia (marcada con rojo por BrdU); posteriormente a las 4 semanas dl hay eventos de diferenciación neuronal distinguidos por la marca co-localizada de BrdU y NeuN. Imagen extraída de (Amamoto et al., 2016).

Más recientemente se reportó un atlas del cerebro del ajolote en el que, a través de Stereo-seq (una forma de secuenciación de célula única que retiene la posición de cada célula en relación al tejido del que se está extrayendo la muestra), se analizaron los perfiles de expresión génica del telencéfalo del ajolote de forma *in situ*. Este grupo reportó marcadores comunes para glía radial como *Sox2*, *Gfap*, *Nes*, *Vim*, entre otros. Aunado a lo anterior, también se encontraron 3 subgrupos de RGC basados en su expresión de genes particulares

y su posición, son: *Wnt*⁺ (WNTRGC) en la zona del palio medial y dorsal, *Sfrp1*⁺ (SFRPR1RGC) en la zona del palio lateral y *Ccnd1*⁺ (CCND1RGC) en la región ventricular ventral, adyacente al estriado y el septum. Además, este grupo fue capaz de identificar un tipo de glía radial **reactiva** (REARGC) presente únicamente en un contexto de lesión y localizado en la región donde se realizó una lesión mecánica en el palio dorsal; esta población está presente entre los 2 a 20 días después del insulto y se caracteriza por expresar marcadores como *Nes*, *Krt18*, *Tnc* y *Ccna2*, involucrados en el mantenimiento de la troncalidad y en la alta proliferación celular. Otro aporte valioso por parte de este grupo, fue la identificación de la glía radial del desarrollo (DRGC) y su similitud con la REARGC, pues conservan un mismo patrón de expresión génica además de que cuentan con un mismo eje de diferenciación neuronal que parte de la RGC (ya sea DRGC o REARGC), a progenitores intermedios, neuronas inmaduras y finalmente neuronas maduras. Todo este proceso ocurre en paralelo a la migración que ocurre por parte de la glía radial desde la región radial ventricular hacia las regiones neuronales por debajo de la superficie pial (Wei et al., en revisión)

2.6 El genoma del ajolote

Los análisis genéticos como: ChIP-Seq, CRISPR, ATAC-Seq, Hi-C, entre otros, sobre el ajolote son, al día de hoy, escasos y limitados debido al tamaño de su genoma, el cual mide 32 giga pares de bases (10 veces más que el humano); cuenta con 14 cromosomas, de los cuales se han reportado la secuenciación del 27.3 Gb de su contenido (Smith et al., 2019), además de cerca de 23,000 genes que codifican para proteínas. Se cuenta con un genoma de referencia en el sitio <https://www.axolotl-omics.org/> realizado por Nowoshilow y colaboradores, generado a partir de la secuenciación del mRNA de 22 tejidos distintos, dichos transcritos se alinearon en un 85% al genoma, contribuyendo al 95% de la longitud del genoma del ajolote, siendo el ensamblaje más largo y rico hasta la fecha (Nowoshilow & Tanaka, 2020).

El largo de su tamaño se debe a la expansión de regiones intrónicas, intergénicas y la multiplicación de repeticiones largas terminales (LTR) que componen cerca del 66% de su

genoma (Nowoshilow et al., 2018). Es de interés mencionar que, genes ortólogos a humanos y ratones cuentan con las mismas regiones intrónicas, pero estas son alrededor de 13 a 16 veces más largas en el ajolote (Evans et al., 2018). De particular importancia es resaltar que los intrones en genes involucrados en el desarrollo -y posiblemente regeneración- son más cortos que genes no involucrados en este proceso, sugiriendo que este patrón permite la rápida transcripción y sobre expresión de estos genes en contextos específicos como el de la regeneración.

2.7 Regulación de la regeneración vía miRNAs

Una forma de silenciamiento génico se lleva a cabo a través de interferencia de ARN (iRNA). En específico, por micro ARNs (miRNAs) -nucleótidos no codificantes de 20 a 30 bases de largo-. Los miRNAs comienzan siendo ARN de doble hebra que se procesa en varios pasos enzimáticos para luego cargarse en un complejo proteico denominado RISC (RNA induced silencing complex), el cual reconoce el extremo 3' de la región no traducida (UTR) del mRNA a silenciar y se aparea con la secuencia complementaria a la hebra guía del miRNA. El resultado de este proceso es un bloqueo del acceso de la maquinaria de traducción a la región codificante del mRNA; regulando así la expresión de genes particulares que deben ser encendidos o apagados al momento de una lesión, por ejemplo (Erickson & Echeverri, 2015) (Craig et al., 2014) (Dana et al., 2017). Los miRNAs suelen estar codificados en regiones intergénicas e intrónicas, lo que implica que algunos de ellos se agrupan o formen **clusters** en estas regiones. Estos clusters suelen ser transcritos como un transcrito policistrónico, codificando para múltiples miRNAs que tendrán perfiles de expresión similares. De hecho, en humanos el 40% de los miRNAs están clusterizados y están involucrados en distintos padecimientos como el cáncer (Stark et al., 2021).

Se ha observado que el ajolote re-activa genes involucrados durante el desarrollo embrionario en el proceso de regeneración (Zhu, Pao, et al., 2012) y que algunos de estos están conservados en mamíferos, sin dotarlos de las mismas capacidades regenerativas. Los RNAs no codificantes representan el 73% de los transcritos del ajolote (Caballero-Pérez et al., 2018) y su presencia en distintos paradigmas de regeneración en este animal podría

elucidar una función generalizada de estos en vías de proliferación o diferenciación celular, remodelamiento de la cromatina, modificaciones transcripcionales y post-traduccionales, regulación de la expresión, etc. que llevados a un modelo humano, promoverían la activación de los genes involucrados en el desarrollo, pero en un estado adulto o distinto al embrionario con fines regenerativos.

La identificación de miRNAs se ha realizado sobre modelos de regeneración de médula espinal y extremidades, partiendo de muestras transcriptómicas en distintos tiempos de la regeneración que son comparadas con bibliotecas y transcriptomas de referencia con el fin de cuantificar la expresión diferencial de distintos miRNAs a través del periodo de diferenciación y su contribución con modelos de pérdida de función. Por ejemplo, está el trabajo realizado por Gearhart y colaboradores. Este grupo evaluó el perfil transcriptómico de miRNAs de 20 a 22 nucleótidos de muestras de colas de ajolotes no lesionados, y en contraparte, blastemas formados en la cola luego de una amputación, comparándolos con librerías ya existentes y midiendo su expresión a diferentes días de regeneración a través de qRT-PCR. En la Tabla 1 figuran los miRNAs involucrados con el mantenimiento de un estado indiferenciado durante un proceso de proliferación inicial como *Let-7a*, cuya expresión disminuye a medida que la población celular del blastema comienza a diferenciarse. En un caso inverso, el miR-206 involucrado en el mantenimiento del estado diferenciado de fibras musculares (además del miR-1 y miR-133) (Georgantas et al., 2014), se encuentra casi ausente durante el inicio de la regeneración, regresando a un estado basal a los 14 días después de la amputación, siendo consistente con la necesidad de desdiferenciar el tejido adyacente a la lesión para formar el blastema. Además, identificaron nuevos miRNAs como el *Amex-miR-pn2533* y *Amex-miR-pn3918* expresados en el blastema temprano y regresando a niveles homeostáticos los 7 dda. Al inhibir el *Amex-miR-pn3918* notaron que se formaba una vesícula terminal aberrante en el extremo de la cola regenerada del ajolote, misma que en un grupo control sería remodelada para dar lugar a una cola nueva y funcional; también notaron que hubo defectos en la regeneración axonal en el tejido reconstruido de la cola (Gearhart et al., 2015).

Molécula	Función	Pico de expresión	Regreso a estado basal	Fuente
PL2,NANOG	Biogénesis de piRNAs, mantenimiento de células troncales germinales	5 dda	15 dda	(Zhu, Pao, et al., 2012)
PL1		15dda	25dda	
Let-7a	Mantenimiento del estado indiferenciado	7dda	>14dda	(Gearhart et al., 2015)
miR-206	Diferenciación celular (músculo)	7 dda	14dda	
miR-21	Regular niveles de Jagged-1	7dda	>14dda	
Amex-miR-pn2533	Supuesto papel suprimiendo genes involucrados manteniendo el estado diferenciado	3dda	7dda	
Amex-miR-pn3918	Promotor de reconexión axonal	3dda	7dda	
miR-125b	Su silenciamiento se ve necesario para la regeneración axonal	7dda	>7dda	(Diaz Quiroz et al., 2014)
miR-196	Involucrado en la identidad posicional del tejido y el tamaño del regenerado	7dda	30dda	(Sehm et al., 2009)
miR-200a	Involucrado en la regulación del complejo de transcripción AP-1 y reconexión axonal	3dda	>7dda	(Sabin et al., 2019)

Tabla 1. Se muestran los distintos miRNAs estudiados en *A. mexicanum* que tienen una función durante la regeneración y se señalan sus dinámicas de expresión en el tiempo. dda: días después de la amputación.

El miR-196 también se ha visto estudiado en el modelo de amputación de SC y se sabe que regula la tasa de división celular en las etapas tempranas de la regeneración, donde actúa como regulador de vías donde participan morfógenos como *Pax7*, *Bmp4* y *Msx1*; al inhibir este miRNA se obtuvo una cola acortada a comparación con un grupo control, además de que en la punta de la cola regenerada había una vesícula aberrante, sugiriendo una participación de este miRNA en la migración y organización celular durante la extensión del tejido (Sehm et al., 2009).

3. ANTECEDENTES

En experimentos realizados por los grupos del Dr. Velasco y del Dr. Chimal- Monroy, se realizaron lesiones mecánicas sobre el palio dorsal del telencéfalo de ajolotes adultos para remover una porción del mismo y evaluar el perfil transcriptómico durante la regeneración. Para los tiempos: 0.5, 1, 1.5, 3 y 6 horas después de las lesiones se extrajeron muestras del tejido más próximo al sitio de la lesión, además de contar un control (tiempo 0) sin lesionar para obtener proteínas y RNA total para que fuera secuenciado, con la finalidad de identificar genes que fueran diferencialmente expresados durante la etapa temprana de la regeneración del telencéfalo y generar un perfil transcriptómico, proteómico y de miRNAs. Se usó como referencia para el alineamiento un transcriptoma ensamblado *de novo* realizado en la universidad de Medipol en Turquía. En el análisis de mRNAs se encontró, a través de un análisis de componentes principales (PCA), que los niveles de expresión de distintos genes eran parecidos para dos perfiles distintos: uno temprano relacionando a los tiempos 0 y 30 minutos post-daño (pd); y otro tardío relacionando los tiempos 60, 90 y 360 minutos (6 horas) pd (Figura Suplementaria 2). Posteriormente, a través de fijar parámetros como un $FDR \leq 0.05$ (False Discovery rate) y un $\log_2FC \geq |1.5|$ (\log_2 fold change) se identificaron 43 genes diferencialmente expresados entre todas las condiciones.

Los transcritos reportados como diferencialmente expresados se asocian a procesos ontológicos como: remodelamiento de la cromatina (*Cbx4*, *Cenpv*) (Barrero & Belmonte, 2013), regulación del citoesqueleto (*Actb*, *Tubb3*, *Map6* y *Pfn2*) (Blanquie & Bradke, 2018), actividad neuronal (*Npy*, *Caly*, *Dlgap1*, *Nsg2*). Además, *JunB* y *Marcks* se reportaron

previamente en la literatura como importantes en la regeneración de médula espinal en ajolote (Sabin et al., 2019). En la Tabla 1 de la información suplementaria se muestran los 43 genes encontrados expresados diferencialmente.

Por otro lado, se generaron librerías de secuenciación para miRNAs siguiendo el protocolo Illumina, luego se llevó a cabo la secuenciación de nueva generación, que fue realizada en el instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM, en el equipo Next-Seq 500 en una configuración pareada de 75 ciclos (2x48). De este proceso se obtuvieron datos crudos en formato *fastq*.

4. HIPÓTESIS

Después de una lesión mecánica en el telencéfalo del ajolote ocurren cambios tempranos en el perfil de expresión de mRNA, miRNAs y proteínas que establecen la respuesta inicial al daño que antecede y es necesaria para el inicio de la regeneración.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Conocer los perfiles de expresión de mRNA, miRNAs y proteínas durante la regeneración del cerebro de ajolote después de un daño mecánico.

5.2 Objetivos particulares

- Analizar la expresión de miRNAs encontrados a través de secuenciación de nueva generación, a partir de muestras de telencéfalo de ajolote a distintos tiempos de regeneración del palio dorsal y realizar un análisis de los posibles blancos.

- Caracterización del proteoma del ajolote a partir de reportes de espectrometría de masas generados a distintos tiempos de regeneración del telencéfalo del ajolote.

6. METODOLOGÍA

6.1 Procesamiento de miRNAs

Los datos crudos de secuenciación obtenidos por el IBt fueron enviados al colaborador Turan Demircan (Departamento de biología médica, Universidad de Mugla, Turquía) para su alineamiento con un genoma de referencia. El procesamiento de los datos crudos -corte de las regiones primers/linkers y filtración de muestras con baja calidad- se realizó usando el software FASTQC (Simon Andrews, 2020), el software Flexbar sirvió principalmente para filtrar las muestras con mala calidad fijando un **phred score** menor a 30. Posteriormente se procedió al alineamiento de las muestras con la herramienta OASIS (versión 2.0)(Rahman et al., 2018). Esta herramienta fue utilizada para mapear y cuantificar los miRNAs contra un genoma de referencia de *Homo sapiens* (hsa). Se filtraron los miRNAs con parámetros como permitir hasta un 10% de *mismatch* en la longitud de la lectura, así como que la longitud de la lectura fuera mayor a 15 y menor a 40 nucleótidos. También, los miRNAs con cuentas menores a 10 fueron eliminados como se describe en (Demircan et al., 2020).

Para el análisis bioinformático se inició filtrando los miRNAs con baja expresión (conteo menor a 40) usando la paquetería de R/Bioconductor **edgeR** (Robinson et al., 2009), después se normalizaron los datos usando **voom** una herramienta de la paquetería **limma** (Ritchie et al., 2015), para finalmente hacer el análisis de expresión con la misma paquetería basándose en ajustes lineales y haciendo una corrección por efecto de lote, generado al muestrear en distintos días los cerebros de ajolotes. Los parámetros fijados para delimitar la expresión diferencial fueron $p_{adj} \leq 0.05$ y un $\log_2FC \geq |1|$. El análisis de ontología de genes (GO) y vías sobre representadas de la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* fue realizado usando el lenguaje de programación R, con las paqueterías multiMiR (Ru et al.,

2014) y ClusterProfiler (T. Wu et al., 2021), respectivamente. Este análisis consistió de 2 procesos: ubicar todos los posibles blancos de los miRNAs diferencialmente expresados y realizar el análisis de ontología y el otro, validar las proteínas diferencialmente expresadas obtenidas en este análisis contra los posibles blancos de los miRNAs obtenidos y realizar el análisis de ontología.

6.2 Procesamiento de muestras de proteínas

De un lote previo de ajolotes lesionados a las condiciones 0, 30, 60, 90, 180 minutos y 6 horas, se recolectaron 42 muestras totales en donde se pueden agrupar 8 para la condición control (0 hrs), 6 para 0.5 hrs ; 8 para 1, 1.5 y 6 horas y 4 para 3 horas. La proteína de estas muestras se recuperó mediante una extracción con TRIzol (siguiendo el protocolo del fabricante), posteriormente las muestras se enviaron a la unidad de proteómica del CINVESTAV para su cuantificación y análisis de espectrometría de masas. Se realizaron *pools* de muestras con el fin de obtener una mayor concentración de proteínas que cumplan con el requerimiento de concentración (200 µg). Cabe señalar que para las condiciones de 30mins y 3 horas no se realizaron *pools*, sino que fueron replicados biológicos.

Se realizó la espectrometría de masas con el método *Shotgun*, que consiste en la fragmentación por triptinización de las proteínas de la muestra junto con un proceso de espectrometría de masas en tándem, para proceder a analizar el espectro de los péptidos digeridos y alinearlos con una base de datos en la que se concatenó la base de datos de proteínas de anfibios del repositorio UNIPROT y las proteínas del arreglo transcriptómico (versión 3.4) del sitio *axolotl-omics.com* que suma transcritos de más de 10 tejidos distintos de ajolote. Se realizaron 54 inyecciones totales: 9 por condición, realizando 3 replicados técnicos por cada replicado biológico. El archivo de salida fue un archivo “.xls” en donde se depositaron las abundancias de 27,200 proteínas de ambas bases. Estas proteínas fueron curadas asegurando que cumplieran con el criterio de que contuvieran al menos un péptido único y que no presentaran alineamiento en sentido contrario (del extremo amino al carboxilo), pues esto correspondería a un falso positivo. Se obtuvo un número de 524 proteínas que se identificaron en una condición únicamente. Por otro lado, las proteínas cuantificadas presentes en todas las condiciones fueron 1387 terminado el filtrado.

Para saber si el equipo estaba bien calibrado y era preciso en el llamado de péptidos, se realizaron análisis como el de la Figura Suplementaria 6, donde se observa graficada la relación masa- carga de los péptidos presentes en las 54 inyecciones contra el error de masa (desviación de la masa contra lo teórico). Importante de esta figura es notar que los péptidos denotados “PepFrag1” y “VarMod” tiene un alto puntaje en el *score* de confiabilidad realizado por el equipo al cumplir con 14 parámetros fisicoquímicos como menor desviación del error, *merge* teórico/practico, intensidad de la señal previa, probabilidades de fragmentación, tiempo de retención, movilidad iónica, etc. Además, este par de clasificaciones de péptidos corresponden al 83% de la totalidad de péptidos analizados, indicando un procesamiento bueno de las muestras por el equipo. También es importante destacar que la mayoría de estos péptidos caen en el rango de -10 a 10ppm del error de masas, que es el rango establecido para decir que son confiables. Hay un remanente de péptidos del 13.5% que son caracterizados como “PepFrag2”, son aquellos que no cumplen con todos los parámetros fisicoquímicos del *score*; el porcentaje restante de los péptidos corresponde a péptidos no tripsinizados, o no analizados por causa de pérdidas de la muestra.

El análisis bionfornático se realizó usando la paquetería **limma** de R, iniciando con normalizar los datos por cuantiles, con el objetivo de dar a las diferentes distribuciones de datos generadas por las distintas corridas en el espectrómetro las mismas propiedades estadísticas reduciendo la variación entre corridas. De las 1387 proteínas analizadas en total, había lectura de abundancia para al menos 2 de las 3 réplicas, por lo que ninguna proteína se filtró del análisis y se realizó consecuentemente una imputación de los datos faltantes a través de una regresión lineal que genera la paquetería al tiempo que hace el análisis de expresión diferencial. Para la obtención de las DEP *-differentially expressed proteins-* se fijaron parámetros de filtrado del cambio en el nivel de inducción $\log_2FC \geq |2|$ y el $\log_{10}pvalue < 0.01$. Posteriormente se hizo un análisis de enriquecimiento (Gene Set Enrichment Analysis) usando la paquetería ClusterProfiler para las 524 proteínas exclusivas y luego para las proteínas diferencialmente expresadas.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de miRNAs diferencialmente expresados

El análisis de componentes principales (PCA) reduce las dimensiones de un *dataset* a 2 y muestra la agrupación de las muestras respecto al parecido que exista entre ellas en términos de niveles de expresión, por lo que la proximidad o alejamiento entre las condiciones en el eje de las X, donde se encuentra el componente principal 1, indica el parecido del perfil de expresión de las condiciones que se están comparando. De tal forma que si se alejan bastante una de otra se hablaría de perfiles distintos, o si se encuentran en proximidad se hablaría de un perfil de expresión similar.

Con base en lo anterior, se comparó el patrón de expresión de las muestras de mRNA generado por *Ortega, A., (sin publicar)* que describió un programa de expresión temprano - donde 0, 30 y 60 minutos se agrupan- y uno tardío que comprende 3 y 6 horas. (Fig. Suplementaria 1). Mediante el uso de la paquetería DESeq2 (Love et al., 2014) para R/Bioconductor se hizo una corrección por el efecto de lote de la tabla de conteos de los miRNAs y se obtuvo un PCA que se muestra en la Figura 3. Las formas geométricas de la Figura 3 señalan en qué lote fueron procesadas las muestras 1-3 y los colores la condición temporal que representan; se tiene que la condición control -correspondiente al tiempo cero- está localizada del lado izquierdo del plano y no está tan agrupada consigo misma como se esperaría, señalando variabilidad entre estas muestras. Además, entre las condiciones más semejantes a 0hrs se encuentra 1hr y 1.5hrs; del lado derecho del plano se agrupan las condiciones 0.5, 3 y 6hrs, haciendo notar que los perfiles de expresión no son tan discretos entre los tiempos tempranos y tardíos (Figura 3). Una segunda forma de observar el cambio en los perfiles de expresión de miRNAs fue agrupar las muestras de los tiempos 0.5, 1, 1.5, 3 y 6 horas en un único grupo denominado **regeneración (REG)** que se comparó contra la condición **control (CTL= 0 hrs)**; de estas agrupaciones se procedió a generar nuevamente un PCA (Figura 4) que hace notar la dispersión de las muestras de la condición REG y un ligero empalme entre REG y CTL, dando un perfil particular para las condiciones de regeneración.

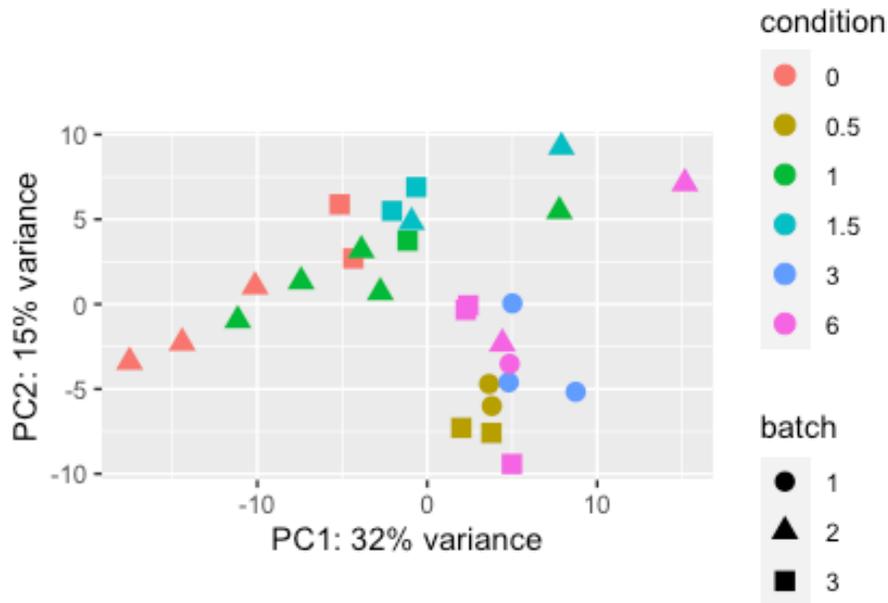


Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA) para perfiles de expresión de miRNAs de todas las condiciones ajustadas por el efecto de lote.

Una vez realizado el mapeo de los miRNAs sobre el genoma de referencia, se obtuvieron análisis de expresión diferencial (DE) bajo las condiciones anteriormente descritas (REG vs CTL). En el gráfico de volcán (*volcano plot*) de la Figura 6 se pueden observar los siete miRNAs más sobre o sub expresados. Para obtener la lista de 32 miRNAs diferencialmente expresados (Tabla 5) se seleccionaron aquellos que tuvieran un $\log_2FC \geq |1|$ (fold change) que en la figura se muestra como el eje horizontal y un $FDR \leq 0.05$ (False Discovery rate) que es el eje vertical, estos parámetros permitirían seleccionar únicamente a los puntos rojos en la figura. De estos 32 miRNAs, 25 están sobre expresados mientras que 7 están sub expresados.

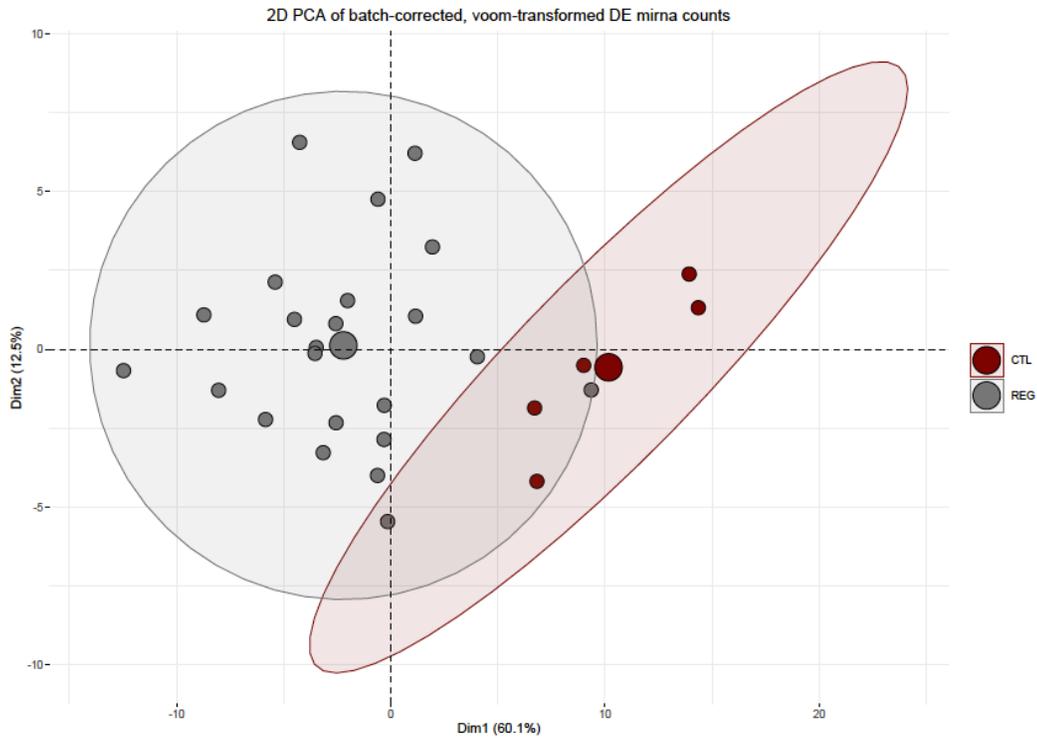


Figura 4. Análisis de componentes principales (PCA) para perfiles de expresión de miRNAs de las condiciones REG (tiempos mayores a 0 horas) vs CTL (0 horas).

Posteriormente se hizo un análisis de los blancos sobre los que podrían estar actuando los miRNAs identificados y posteriormente se organizaron los genes detectados de acuerdo a ontología genética (GO) y de vías sobre representadas en KEGG. Este proceso requirió ingresar los 32 miRNAs diferencialmente expresados entre las condiciones REG vs CTL a la paquetería de R *MultiMiR* que buscó en distintas bases de datos blancos de mRNA para los miRNAs sub y sobre regulados

Se encontraron 3568 genes que pudieran ser afectados por los miRNAs sub expresados en el análisis de GO, entre los 5 principales procesos biológicos (BP) (que cuentan con mayor número de los mRNAs objetivo figuran: “autofagia” (número de genes, n=175, padj<0.05), “procesos que utilizan el mecanismo autofágico” (n=175, padj<0.05), “modificaciones covalentes de la cromatina” (n=164, padj<0.05), “modificaciones de histonas” (n=156, padj<0.05) y “regulación del desarrollo de proyecciones neuronales” (n=151, padj<0.05). Las 5 principales funciones moleculares (MF) son: “adhesión molecular/unión de moléculas” (n=160, padj<0.05), “actividad proteica de serina/treonina” (n=132, padj<0.05), “Actividad de activación de transcripción por unión a ADN (específica de RNA Polimerasa II)” (n=126, padj<0.05), “actividad proteica de transferencia de ubiquitina” (n=125, padj<0.05) y “unión a pequeñas GTPasas” (n=122, padj<0.05).

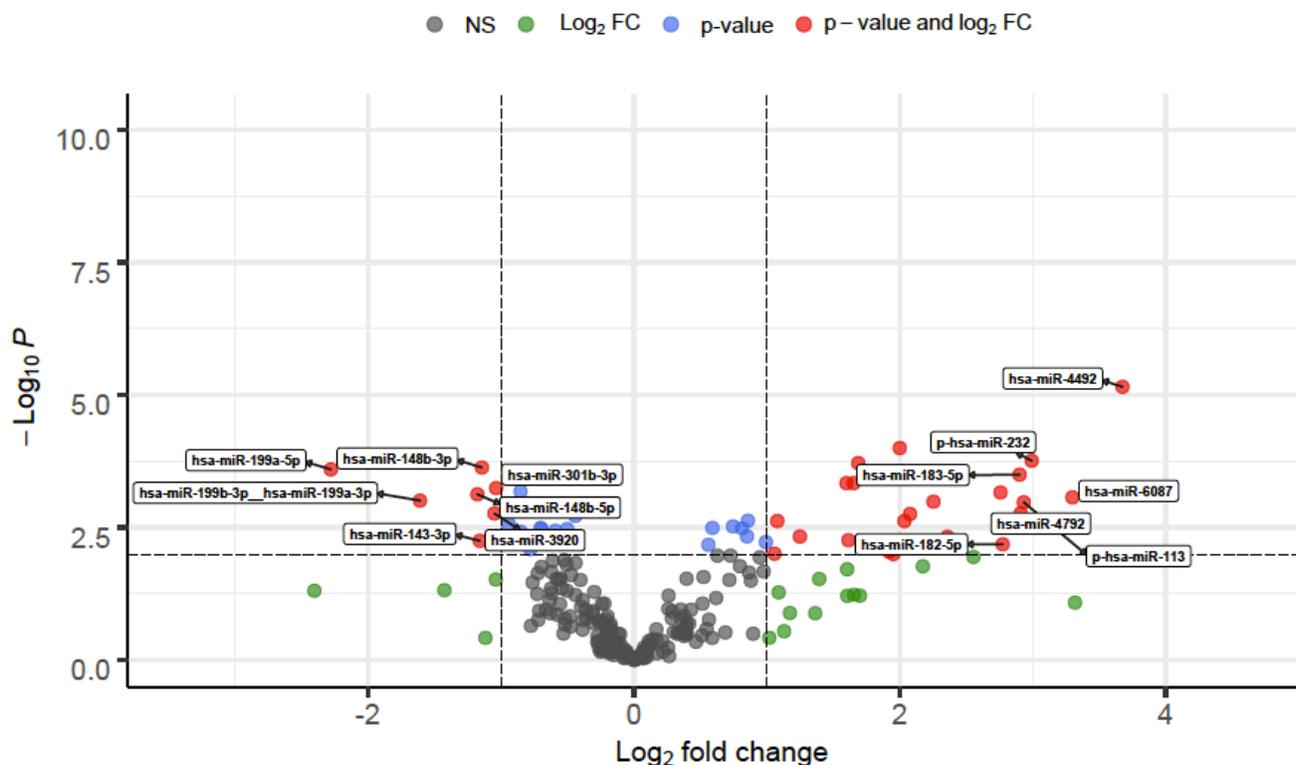


Figura 5. Volcano plot para los genes diferencialmente expresados. Del lado izquierdo se observan los sub expresados en rojo y los sobre expresados del lado derecho con el mismo color. NS: Sin significancia, Log₂FC: cambio en la inducción del gen, p-value: valor de p o FDR, p-value and Log₂FC: puntos que cumplen con el criterio de tener Log₂FC mayor o igual a 1 y FDC menor o igual a 0.05.

Analizando ahora los miRNAs sobre expresados, se tuvieron 5526 posibles blancos de mRNA, donde los principales BP fueron: “modificaciones covalentes de la cromatina” (n=227, padj<0.05), “regulación de las fases del ciclo celular” (n=227, padj<0.05), “catabolismo de proteínas por proteosoma” (n=222, padj<0.05), “regulación de la morfogénesis celular” (n=222, padj<0.05) y “modificaciones de histonas” (n=218, padj<0.05). Es interesante mencionar que también se encontraron blancos para “axonogenesis” (n=213, padj<0.05). Las principales MF fueron iguales que para la condición sub expresada, a excepción de la adición de “actividad de ATPasa” (n=198, padj<0.05).

miRNAs diferencialmente expresados entre REG vs CTL		
<i>Sobreexpresados</i>		<i>Subexpresados</i>
hsa-miR-4492	hsa-miR-6777-5p	hsa-miR-301b-3p
hsa-miR-6087	p-hsa-miR-103	hsa-miR-3920
p-hsa-miR-232	hsa-miR-367-5p	hsa-miR-148b-3p
p-hsa-miR-113	p-hsa-miR-200	hsa-miR-143-3p
hsa-miR-4792	hsa-miR-4448	hsa-miR-148b-5p
hsa-miR-183-5p	hsa-miR-1290	hsa-miR-199b-3p_hsa-miR-199a-3p
hsa-miR-182-5p	hsa-miR-125b-1-3p	hsa-miR-199a-5p
hsa-miR-7112-5p	p-hsa-miR-336	
hsa-miR-96-5p	hsa-miR-125a-3p	
p-hsa-miR-89	hsa-miR-150-5p	
hsa-miR-4259		
p-hsa-miR-139		
hsa-miR-1973		
hsa-miR-4443		
hsa-miR-4508		

Tabla 2. Tabla en donde se listan los miRNAs diferencialmente expresados bajo la condición de regeneración (REG) vs control (CTL). Los miRNAs marcados en negritas son aquellos 7 que tiene la mayor sobre o sub expresión, respectivamente.

Para el análisis de vías sobre representadas de KEGG se encontraron 1760 y 2632 mRNAs que son posibles blanco de los miRNAs sub y sobre expresados, respectivamente, esto para las condiciones REG vs CTL como se ha realizado de manera previa. Las 5 principales vías encontradas dentro de los 1760 mRNAs de la condición sub expresada son: “Vías de neurodegeneración (múltiples enfermedades)” (n=137, padj<0.05), “Enfermedad de Alzheimer” (n=121, padj<0.05), “Infección de papilomavirus humano” (n=118, padj<0.05),

“vía de señalización de PI3K-Akt” (n=112, padj<0.05) y “Esclerosis amiotrófica lateral” (n=104, padj<0.05). Aunado a lo anterior, las vías de la condición sobre expresada son: “Infección por herpesvirus 1” (n=201, padj<0.05), “vía de señalización de PI3K-Akt” (n=149, padj<0.05), “Infección de papilomavirus humano” (n=142, padj<0.05), “Esclerosis amiotrófica lateral” (n=140, padj<0.05) nuevamente. En la Figura 6 se destacan las vías comunes con participación de los mRNAs blancos para cada condición de expresión de miRNAs.

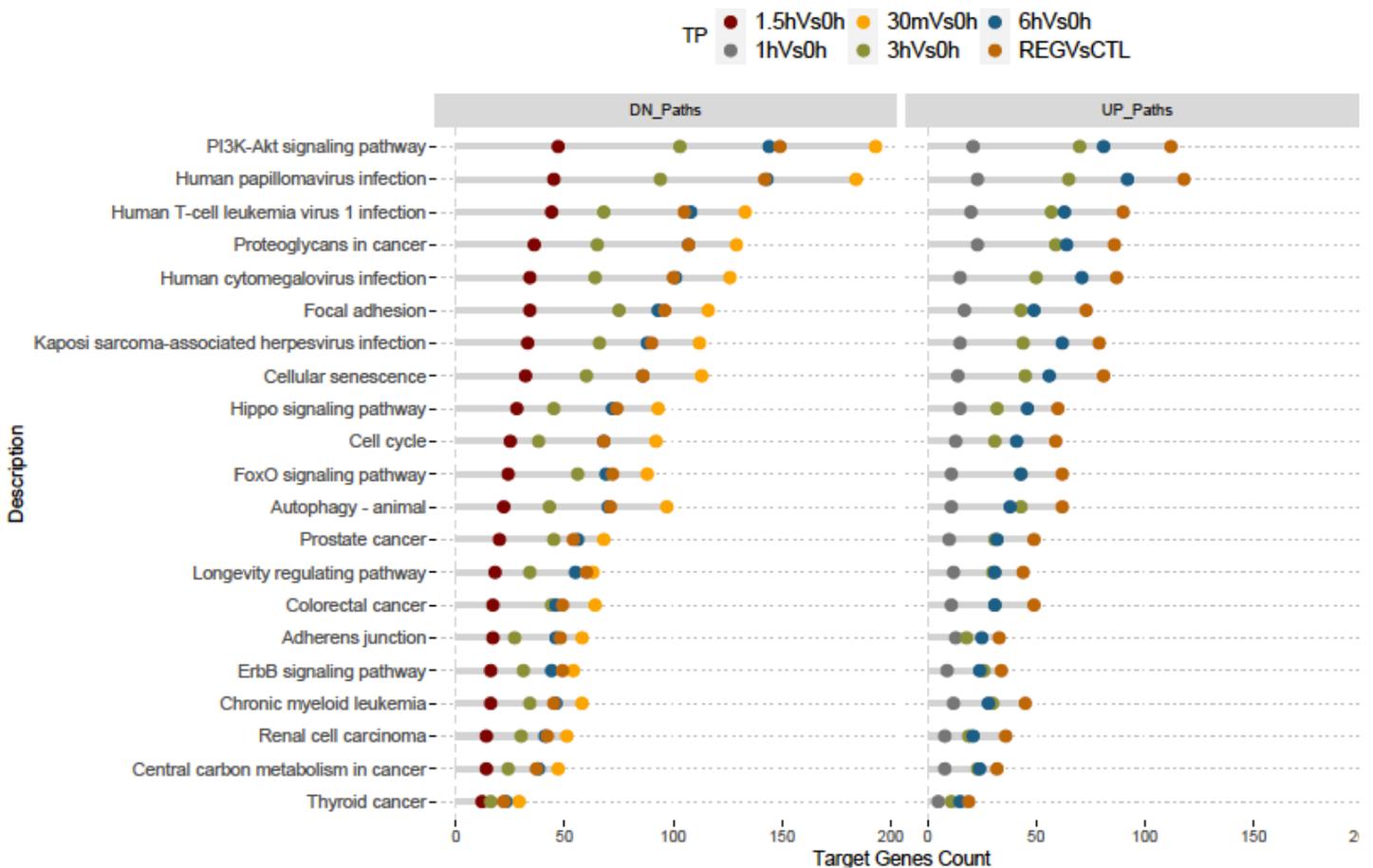


Figura 6. Gráfico donde se muestran las vías comunes afectadas por los posibles mRNA blancos de los miRNAs sub expresados a la izquierda y sobre expresados a la derecha a través del análisis de representación de vías de KEGG. En la parte superior de la figura también se muestra un código de color para distinguir las condiciones 0.5, 1, 1,5 3, y 6 horas de regeneración vs el tiempo 0 y la condición regeneración (REG) vs control (CTL). Material proporcionado por Demircan, T. 2020).

Se hizo uso de la plataforma TargetScanHuman (Versión 7) (Agarwal et al., 2015) para obtener aquellos miRNAs que formaran parte de un clúster. Se encontraron 10 clusters como se muestra en la siguiente tabla donde algunos de ellos tenían altos valores en la escala de conservación entre especies:

miRNA diferencialmente expresado	Clúster
Sobre expresado	
hsa-miR-4492	miR-762/4492/4498/5001-5p
hsa-miR-96-5p	miR-96-5p/1271-5p*
hsa-miR-6777-5p	miR-6777-5p/6889-5p
p-hsa-miR-103	miR-103-3p/107*
p-hsa-miR-200	miR-141-3p/200a-3p* miR-200bc-3p/429* miR-200-5p/550-3p
Sub expresado	
hsa-miR-301b-3p	miR-130-3p/301-3p/3666/4295/454-3p*
hsa-miR-148b-3p	miR-148-3p/152-3p*
hsa-miR-143-3p	miR-143-3p/4770/6088*
hsa-miR-148b-5p	miR-148-5p/6874-3p
hsa-miR-199b-3p_hsa-miR-199a-3p	miR-199-3p/3129-5p*

Tabla 3. Clusters de miRNAs identificados a partir de los miRNAs diferencialmente expresados. (*) Señala los clusters que están conservados entre especies.

7.2 Análisis de expresión diferencial de proteínas

Se obtuvieron 171 proteínas diferencialmente expresadas que estuvieron presentes en una o varias condiciones; en la Tabla 4 se puede encontrar la cantidad que estuvo sobre o sub expresada para cada condición respecto al control. Adicionalmente, se adjunta un archivo “.xlsx” con la lista de estas proteínas. También se hizo un análisis de expresión diferencial entre cada condición como se muestra en las Tablas 5. En la Tabla 6 se condensa la información eliminando las proteínas repetidas entre cada condición.

Regulación	0.5hrs	1hrs	1.5hrs	3hrs	6hrs
positiva	15	38	34	15	37
negativa	14	50	34	20	44

Tabla 4. Número de proteínas diferencialmente entre las distintas condiciones comparadas contra el tiempo 0 (control).

0 hr	0.5 hr	1 hr	1.5 hr	3 hr	6hr	
NA	29	88	68	35	81	0 hr
	NA	19	26	18	18	0.5 hr
		NA	16	12	27	1 hr
			NA	1	14	1.5 hr
				NA	7	3 hr
					NA	6 hr

Tabla 5. Número de proteínas diferencialmente entre las distintas condiciones comparadas individualmente.

Condición	Proteínas DE
0hrs vs ALL	171: 86up y 85dw
0.5hrs vs 1, 1.5, 3 y 6 horas	64: 31up y 33dw
1hrs vs 1.5, 3 y 6 horas	46: 32up y 14dw
1.5 vs 3 y 6 horas	15: 8 up y 7dw
3 vs 6 horas	7: 6 up y 1 dw

Tabla 6. Proteínas diferencialmente expresadas encontradas por cada condición comparada contra el control, además de las condiciones CTL vs REG.

También se generó un análisis de componentes principales (PCA) para observar la similitud entre muestras como se muestra en la Fig. 7 y se generó un mapa de calor (*heatmap*) con las principales proteínas diferencialmente expresadas para observar clusters de agrupamiento y nuevamente la similitud de muestras (Figura 8).

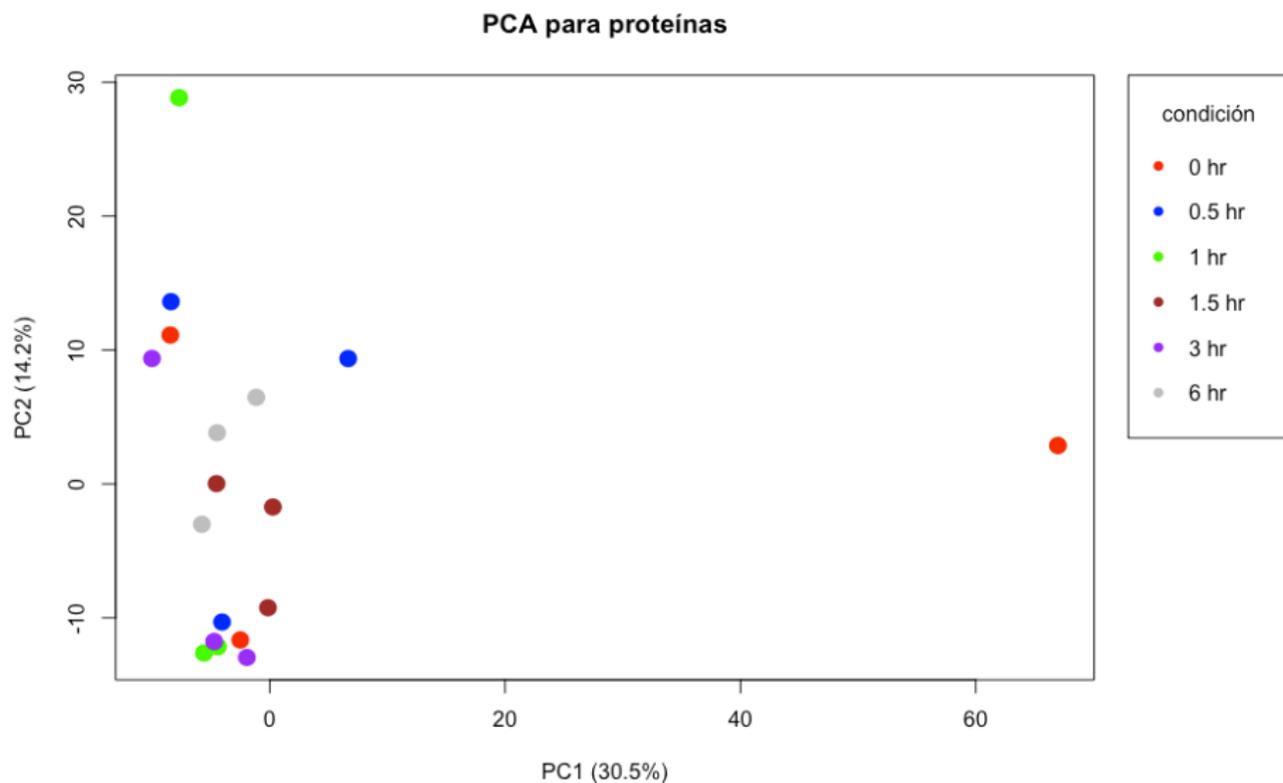


Figura 7. Análisis de componentes principales para cada una de la réplicas de cada condición experimental de las proteínas presentadas.

Para la serie de proteínas exclusivas y cuantificadas se procedió a hacer una búsqueda en las bases de datos, ya sea UNIPROT o *axolotl-omics* de las secuencias FASTA de cada una de ellas. Con dicha secuencia se realizó una búsqueda de secuencias de aminoácidos de estas proteínas (*pblast*) contra proteínas de humano “*hsa*” con la intención de poder obtener un ortólogo en humano y poder realizar la ontología genética sobre un organismo que estuviera bien anotado y mapeado. Luego de realizar el *pblast* en la base de datos de NCBI se consiguieron los identificadores de las distintas proteínas con un porcentaje de identidad entre las secuencias de ajolote y humano; se seleccionaron aquellas con una mejor calificación o *score* entre las secuencias en términos de similitud y porcentaje de cobertura de la proteína.

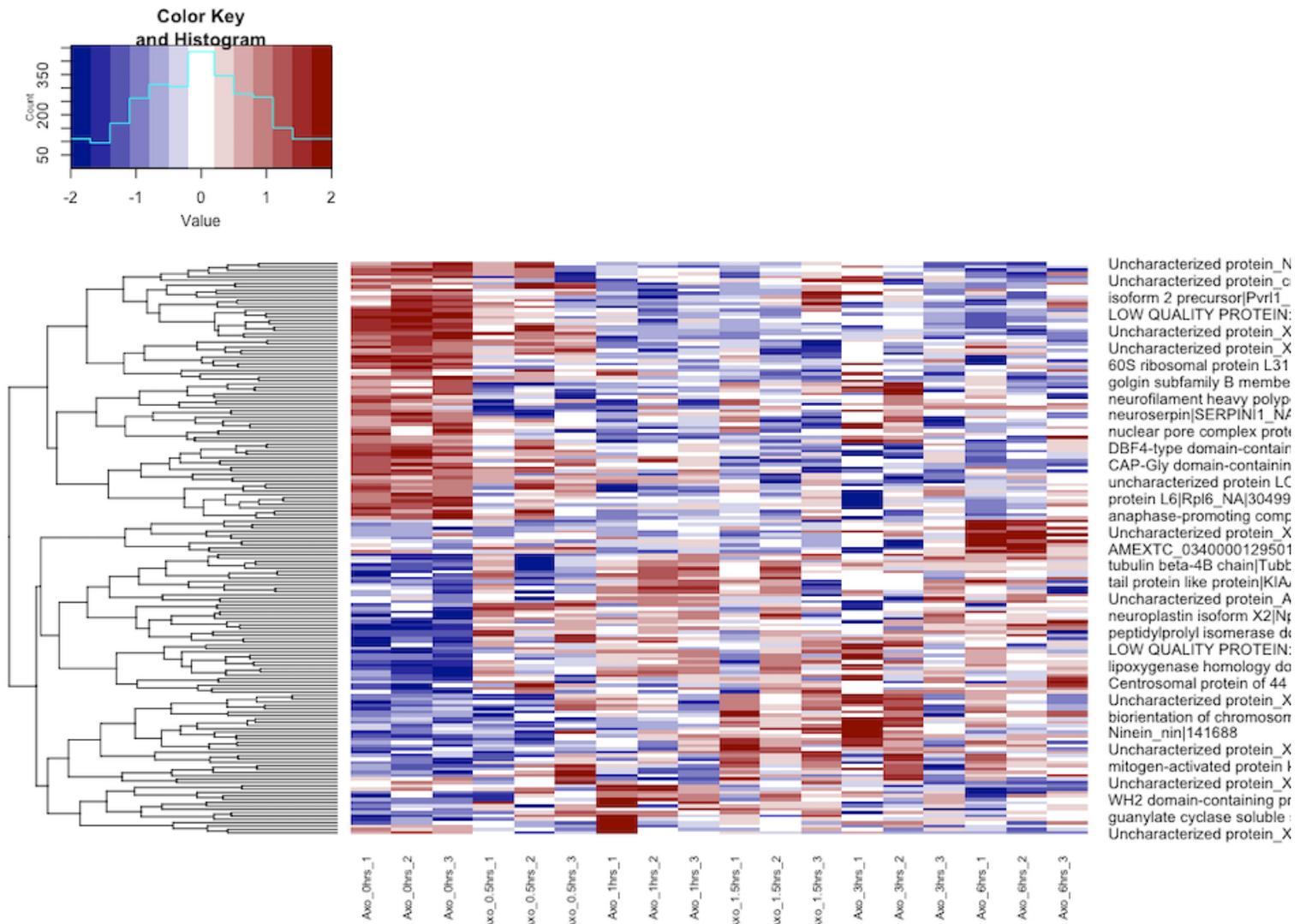


Figura 8. Heatmap donde se puede observar los patrones de expresión de distintas proteínas a manera de cluster.

Por otro lado, se recabo una lista con 523 proteínas iniciales, las cuales fueron denominadas como “proteínas exclusivas”, pues estaban presentes en algunas de las condiciones, pero no en todas ellas. Se tuvo que realizar un filtrado de estas proteínas ya que gran parte de ellas presentaban lectura de abundancia en 1 de los 3 replicados técnicos y esto generaba incertidumbre respecto a su uso ya que podían ser causadas por errores del equipo de espectrometría. Luego de este proceso se obtuvieron 151 proteínas con lectura de abundancia en al menos 2 de 3 réplicas por condición. De estas proteínas 26 tuvieron lectura de abundancia únicamente en la condición 0hrs, 14 en la condición 0.5hrs, 11 en la condición 1hrs, 7 en la condición 1.5hrs, 28 en la condición 3hrs y 65 en la condición 6hrs (lista completa de estas proteínas en el archivo adjunto a este documento).

Se hizo un análisis de enriquecimiento genético (*Gene Set Enrichment Analysis*) inicialmente con las 151 proteínas exclusivas para una sola condición y luego con las 171 proteínas diferencialmente expresadas para todas las condiciones con la finalidad de conocer a qué tipo de proceso se asociaban y si lo hacía a la alza o a la baja; esto se logró con ayuda de la paquetería de R “ClusterProfiler”. Al realizar el análisis de ontología se fijaron los parámetros de $p < 0.05$, $q < 0.1$ y ajuste de p por el método de Benjamini-Hochberg.

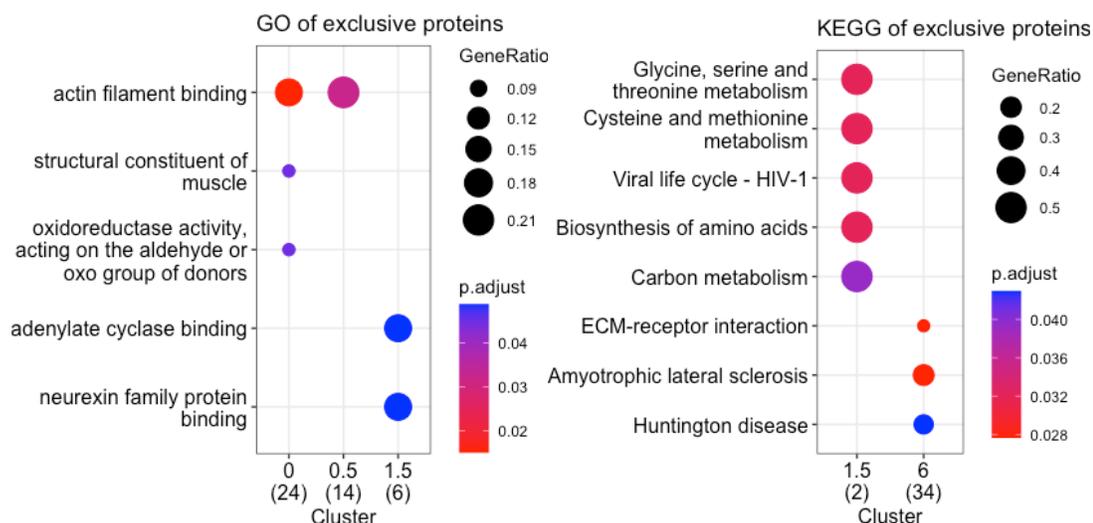


Figura 9. Gráfico de puntos donde se listan los principales procesos regulados con las 151 proteínas exclusivas para alguna condición. En la izquierda se observan los términos enriquecidos en ontología genética, mientras que a la derecha se observan los términos enriquecidos en KEGG. El aumento del diámetro del círculo señala un mayor número de genes para ese proceso y el color tornándose rojo señala un menor valor de p .

En la Figura 9, del lado izquierdo, se muestran las vías enriquecidas analizando en las bases de *gene ontology* para las proteínas exclusivas, de las cuáles solo hubo significancia para los tiempos tempranos del proceso regenerativo 0 a 1.5hrs. El único término compartido “unión a filamentos de actina” se encuentra entre las condiciones temporales 0 y 0.5hrs. Del lado derecho de la figura podemos encontrar las vías enriquecidas usando la base de datos KEGG donde las condiciones 1.5 y 6 horas aparecen significativamente representadas con distintos procesos involucrados al metabolismo y síntesis de aminoácidos.

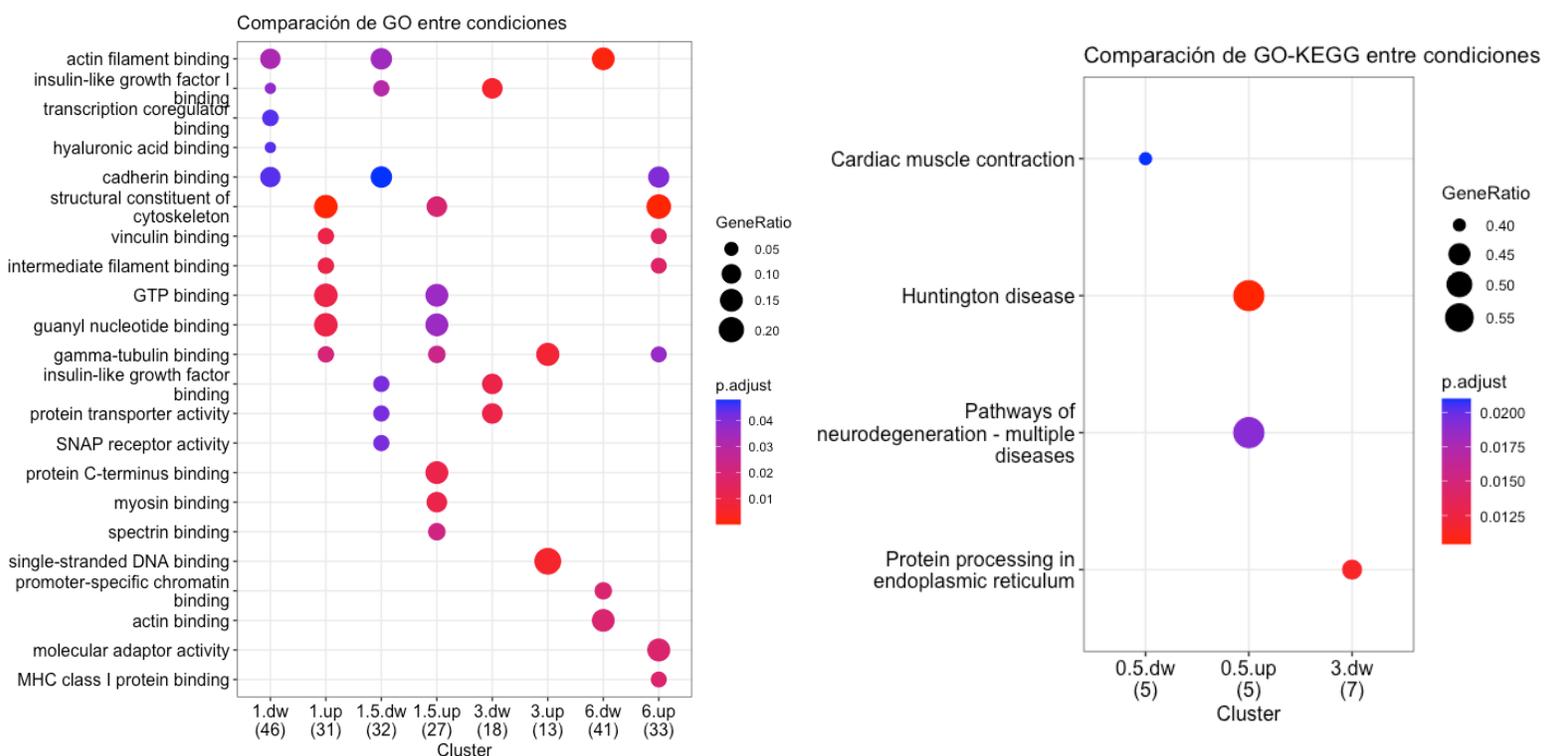


Figura 10. Gráfico de puntos donde se listan los principales procesos regulados con las 171 proteínas diferencialmente expresadas, distinguiéndose entre los procesos afectados por las proteínas sub o sobreexpresadas para cada condición.

Por otro lado, en la Figura 10 se listan los procesos y vías enriquecidas con las proteínas cuantificadas. Del lado izquierdo se puede observar el enriquecimiento basado en GO, mientras que del lado derecho aquél realizado basándose en la base de datos KEGG.

7.3 Relación de los miRNAs y proteínas diferencialmente expresados

De nuestro análisis encontramos que con la lista de 32 microRNAs DE se hallaban 17,553 posibles blancos usando la paquetería MultiMiR, analizando esta información se encontró que el miR- 182-5p es aquel que cuenta con más transcritos como posibles blancos (Fig. 12). Esta información se condensó de manera en que se evitaran las proteínas repetidas, teniendo 7977 proteínas distintas que pueden ser blanco de uno o más miRNAs DE. De la lista anterior encontramos 95 que están dentro de nuestra lista de proteínas DE, por lo que nuevamente se procedió a hacer análisis de ontología genética con este grupo reducido de proteínas esperando encontrar si tienen funciones distintas a las previamente descritas. De lo anterior se obtuvieron las gráficas de la Figura 13.

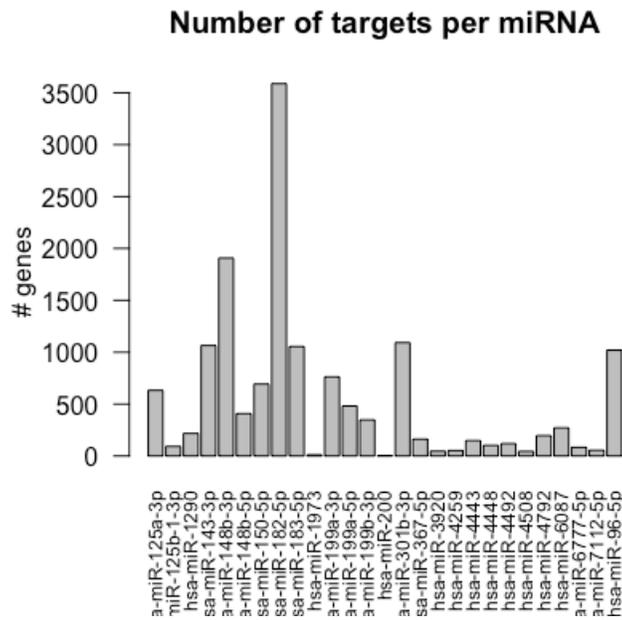


Figura 12. Número de posibles blancos por miRNA.

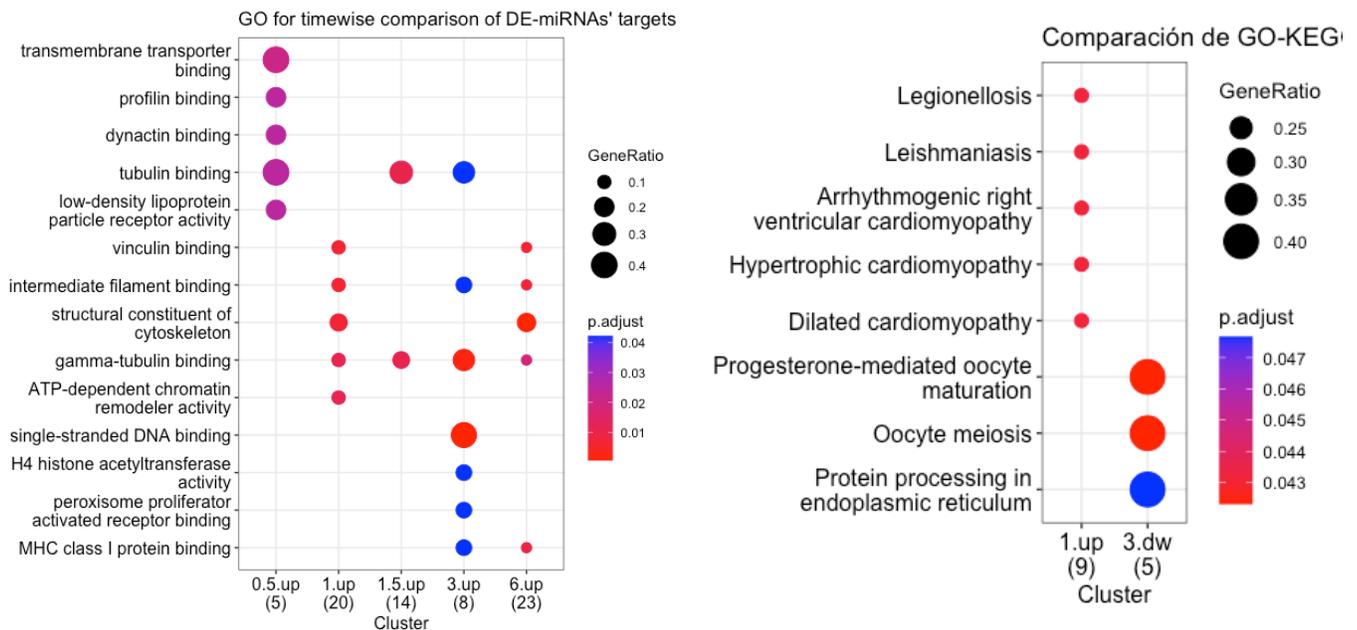


Figura 13. Gráfico de puntos donde se muestran los procesos biológicos activados y suprimidos por las proteínas DE que fueron identificadas como blancos por los miRNAs DE durante la regeneración del ajolote.

Tomando en cuenta que se habían identificado 32 miRNAs diferencialmente expresados entre la todas las condiciones experimentales (REG) vs control (CTL), se procedió a ingresarlos nuevamente a la paquetería de R “multiMiR”, pero en esta ocasión se optó por buscar posibles blancos de aquellas proteínas que están diferencialmente expresadas entre las condiciones CTL vs REG -es decir- entre 171 proteínas. Se buscó una validación de estas 171 proteínas diferencialmente expresadas contra los blancos de los miRNAs diferencialmente expresados, 88 proteínas fueron identificadas como blanco de los 32 miRNAs.

Condición	miRNAs DE	Blancos identificados	Proteínas DE blasteadas a humano	Blancos identificados en proteínas DE
0 vs 0.5hrs	12	14,623	27	16
0 vs 1hrs	3	745	82	3
0 vs 1.5hrs	9	1669	63	6
0 vs 3hrs	10	5410	33	11
0 vs 6hrs	26	11,472	77	48

Tabla 7. Número de proteínas identificadas realizando una comparación entre los posibles blancos de los miRNAs DE entre cada condición vs el control, contra las proteínas obtenidas DE en nuestro análisis. DE: diferencialmente expresados.

8. DISCUSIÓN

Se realizó el procesamiento bioinformático de datos crudos de secuenciación de miRNAs, en donde inicialmente se hizo un análisis de componentes principales que comparara la similitud del perfil de expresión de miRNAs para las distintas condiciones temporales. En este primer análisis se buscó comparar cada condición temporal contra el control (cero horas) como se muestra en la Figura 3 y también todas las condiciones temporales agrupadas contra el control (Figura 4). De este análisis se obtuvo que los perfiles de expresión de ciertas condiciones -1 y 1.5 hrs- se agrupan mejor con la situación control y que, en general, todas las condiciones temporales distintas a cero tienen un perfil de expresión de miRNAs distinto al control. Posteriormente se realizó un análisis de expresión diferencial para obtener aquellos miRNAs que duplicaran su expresión a la alza o se redujera a la mitad baja, de donde se obtuvieron 32 miRNAs.

En el caso de las proteínas, se concatenó una base de datos de anfibios con una base de proteínas exclusivas de ajolote con la que se pudieran alinear las lecturas de abundancia que se reportaron a través de espectrometría de masas. Las muestras utilizadas para este

proceso fueron las mismas de cerebros lesionados de ajolotes a distintas condiciones temporales posteriores al daño usadas para mRNAs y miRNAs. De esta forma se obtuvo una lista de proteínas que fue curada para eliminar los falsos positivos y que diera lugar a identificar 151 proteínas exclusivas, esto es, que hayan estado expresadas en solo una condición temporal. También se identificaron a través del análisis de expresión diferencial 171 proteínas presentes en todas las condiciones.

8.1 Diferencias entre los perfiles de expresión entre transcritos (mRNAs) y proteínas

En el PCA de la Figura suplementaria 1 se observa un agrupamiento de las muestras en dos clusters mayores partiendo de las similitudes en su perfil de expresión de mRNAs, que corresponderían a un tiempo temprano de regeneración (0 a 1hrs) y uno tardío (1.5 y 6hrs). Este agrupamiento, sin embargo, no es correspondiente con el perfil de expresión de proteínas de las muestras de cerebros de ajolotes lesionados. Como se puede ver en la Fig. 7, las muestras se agrupan muy cercanas unas a otras, a excepción de una muestra del tiempo 0 que parece estar muy alejada de todas, debido a que, en lo general, reporta valores de abundancia de proteína mucho menores a los de los otros replicados, probablemente consecuencia de su manipulación o lectura en el equipo de espectrometría de masas. Podría decirse que al ser todas las muestras tan similares en su perfil de expresión de proteínas, no se tendría hasta las 6 horas de regeneración un perfil completamente ajeno a la homeostasis y que ningún cambio relacionado a la respuesta inicial al daño o comienzo de la regeneración ha gatillado un cambio drástico de expresión proteica.

Por otro lado, de la lista de 43 transcritos diferencialmente expresados (Tabla Suplementaria 1) únicamente dos correspondieron totalmente con las proteínas DE: *Hbb*, *Cenpv* y se hallaron 3 homólogos de *Tub4 β* , *Col5a1* Y *Nup98*. Esto no debería ser de sorpresa, pues la forma en la que se analizó la base de datos de proteínas fue a través de la búsqueda de ortólogos con humano lo que puede generar una diferencia sustancial entre secuencias. Además, por el hecho de que existen distintas modificaciones como tasa de degradación del mRNA, sesgo en el uso de codón, sitios de unión al ribosoma y más modificaciones post transcripcionales y traduccionales -y algunas quizás desconocidas que participen en la

regulación de expresión del ajolote-, no se puede esperar un empalme perfecto entre transcriptoma y proteoma, que en la literatura se reporta puede ser de aproximadamente el 40% (Kumar et al., 2016)

8.2 Papel de los miRNAs diferencialmente expresados

El miR-4492 resultó ser el más sobreexpresado en la condición de regeneración y su actividad ha sido descrita en análisis de expresión diferencial de esferoides formados a partir de células de cáncer de mamá, en las cuales este miRNA fue también el más sobreexpresado. Este miRNA estuvo asociado a la expresión de marcadores de pluripotencia de las células cancerígenas, cuya expresión les confirió con una capacidad de proliferación, resistencia a quimioterapia, migración y de reparación muy alta (Boo et al., 2016). El miR-200 está presente en tres clusters: miR-200bc-3p/429 y miR-141-3p/200a-3p están muy bien conservados entre especies, mientras que el clúster miR-200-5p/550-3p no lo está. Se han reportado a los miRNAs del primer clúster como onco-miRs (YONEYAMA et al., 2015), presentes en múltiples tipos de cáncer y cuya presencia influye directamente en la prognosis de los casos. Los onco-miRs están asociados con el silenciamiento el gen *Pten*, gen que participa en la supresión de tumores. Recientemente se descubrió que el segundo clúster - miR-141-3p/200a-3p -está involucrado en la inducción de genes como *Tgfb2* y *Pold1* que forman cicatrices hipertróficas al aumentar la fibrosis y elementos de matriz extracelular, como el aumento en la síntesis de colágeno durante el sanado además de favorecer la transición epitelio-mesénquima. Este clúster afecta el ciclo celular y las reparaciones al ADN (Tu et al., 2018). El miR-96-5p ha sido recientemente señalado como inhibidor de la proliferación celular (impidiendo la progresión ciclo celular), migración y apoptosis de células musculares lisas sensibles a angiotensina II que generan vasoconstricción; también es capaz de regular la transformación fenotípica provocada por *Bmps* y su principal blanco es el gen relacionado a cáncer *Nfat5*. (Tian et al., 2020).

Entre los miRNAs subregulados se encuentra miR-301b-3p, cuyo clúster con miR-130b/301b se ve relacionado en procesos de carcinogénesis. Este miRNA promueve la proliferación, migración e invasión de células cancerígenas en líneas de cáncer de próstata y

cáncer de mama; incluso está dentro de una familia de miRNAs oncogénicos que tienen como blanco genes supresores de tumores como *Tgfb β 2*, *Smad4*, *Pten* (Fan et al., 2021; Fort et al., 2018; Zheng & Bai, 2019). El miR 148b-3p es otro miRNA de relevancia, pues éste participa en la inhibición de la proliferación, progresión del ciclo celular e invasión de líneas de glioma al modular la expresión de *Hotair*, molécula involucrada en regulación epigenética. Este miRNA es capaz de inducir la apoptosis al inhibir a represores de las caspasas 3 y 9, deteniendo el ciclo celular en la fase S (G. Wang et al., 2016). Por otro lado, el clúster miR-148-3p/152-3p también ha demostrado tener propiedades de supresión de tumores en modelos de cáncer de próstata, al tener como blanco principal al factor de pluripotencia *Klf4*, regulando su expresión (Feng et al., 2019).

El miR-143-3p es capaz de modular diversas moléculas en modelos de cáncer, como a *Mapk7* Y *Fosl2* para generar un efecto de inhibición de la proliferación, migración e invasión de células cancerígenas (C. Xia et al., 2018) (X. Sun et al., 2018). De manera particular, este miRNA está involucrado en la pérdida de la capacidad regenerativa del músculo esquelético, esto estudiado a través de cultivos de miocitos y células satélite musculares. Se demostró que este miRNA promueve la miogénesis al regular la expresión de *Myod*. La reducción en la expresión de miR-143-3p en ratones envejecidos se relaciona con una deficiencia en la diferenciación estimulada por *Igfbp5* (otro blanco de este miRNA), al inducir la diferenciación temprana, provoca que los miocitos obtenidos entren en senescencia y no sean funcionales (Soriano-Arroquia et al., 2016). Otro miRNA de interés es el miR-199-3p que también tiene capacidades anti tumorales al regular a *Itga3* o *Nlk* dependiendo el modelo de cáncer, inhibe la migración celular, la invasión de células carcinogénicas y/o estabiliza los niveles de mRNA de *Nlk* que inducirá la apoptosis de células carcinogénicas además de diezmar su potencial clonogénico y de proliferación (Han et al., 2014; Koshizuka et al., 2017). Con el mismo efecto, también regula la expresión de *Snail*, un gen involucrado en la transición epitelio-mesénquima (EMT), un evento que ocurre con bastante frecuencia en distintas formas de cáncer (Zhang et al., 2019). Un aspecto particular de este miRNA, es que sus niveles juegan un papel en la capacidad de inducción a la pluripotencia de células somáticas: Si su nivel de expresión es alto, desfavorece la eficiencia de reprogramación y además inhibe la proliferación celular al detener el ciclo celular en la fase G1; en el caso

contrario, si su expresión es baja, favorece la reprogramación e incrementa la proliferación celular. Este miRNA parece ser regulado por *p53* que también regula negativamente la reprogramación somática (J. Wang et al., 2012).

8.3 miRNAs previamente reportados en la regeneración del ajolote

Se encontró previamente que el miR 125b -presente en las células de la endimoglia del ajolote- modula la acción de la Semaforina 4D sobre las fibras axonales para guiarlas correctamente para su reconexión. También se halló que, en un análisis de expresión diferencial en ratas tratadas con un miR-125b sintético, encontraron sobreexpresados genes como *Nefl*, *Neurod2*, *Sema3*, *Amigo1*, *Colla1*, *Map6* (Denis et al., 2016). Todos ellos involucrados en neurogénesis y neuroprotección. Particularmente, los dos últimos genes también se encontraron diferencialmente expresados en el trabajo previo con mRNAs de este proyecto. También, se tiene que el miR-200 está bastante conservado y que además de las funciones de los clusters en los que se agrupa (descrito con anterioridad), tiene una función esencial en la regeneración de la médula espinal del ajolote (Walker et al., 2022). Este miRNA se sobreexpresa en células de la glía radial en respuesta a una lesión y promueve la formación del factor de transcripción *Ap-1* de una manera no canónica con el heterodímero cFos/JunB ($AP-1^{cFos/JunB}$). Este complejo es capaz de inducir una respuesta pro-regenerativa al acelerar el ciclo celular, remodelar la matriz extracelular e inducir la migración celular a través de los genes que promueve. La inhibición de este miRNA, trunca la regeneración de la médula espinal por completo (Sabin et al., 2019)

Dado que los onco-miRs están sobre-expresados dentro de las 6 primeras horas después de una lesión mecánica en el palio dorsal del ajolote, se puede especular que el ajolote tiene la capacidad de activar un programa de proliferación celular en las primeras horas después de la lesión, y activar en paralelo un programa transcriptómico que fomenta la expresión de genes involucrados en la neurogénesis y neuroprotección. Es importante destacar que por la inducción de miR-125b y miR-200 se está generando un microambiente permisible a la supervivencia de las células adyacentes al daño y a la estabilidad de las fibras axonales que queden libres, evitando el dieback de las mismas.

Integrando el PCA para cada condición con respecto al tiempo 0, es notable que el perfil de expresión de los miRNAs que se encienden 30 minutos después del daño (13miRNAs) es bastante distinto al de la situación control. Esto parte del rápido remodelamiento de la cromatina, que permite la activación de programas de inflamación, inmuno-modulación del daño, re-epitelización, proliferación celular y degradación de la matriz extracelular, entre otros (Sosnik et al., 2017; Tsai et al., 2019). También, son consistentes con los datos de GO, en donde destacaron los procesos de “modificaciones covalentes de la cromatina”, “modificaciones de histonas” y “control de fases del ciclo celular” como los más significativos.

Dado que la re-epitelización es el primer evento que ocurre durante la regeneración y que ésta ocurre a través de mecanismos como la transición epitelio-mesénquima (EMT), se ha reportado que ciertos miRNAs inducen esta transición. Por ejemplo los niveles bajos de miR-199-3p subregulan a *Snail*, y en consecuencia, se desata la EMT (Zhang et al., 2019). Esto es consistente con los resultados que se obtuvieron en este trabajo, en donde además de la subexpresión de miR-199-3p que favorece la EMT, otros miRNAs con capacidades anti-carcinogénicas involucrados en la detención del ciclo celular, inhibición de la proliferación y favorecimiento de la apoptosis fueron subregulados. Recordando que el ajolote tiene una muy baja incidencia de cáncer y que tolera la expresión de oncogenes y señalizaciones anti-apoptóticas, diversas mutaciones en *p53* y una matriz extracelular menos rígida (Villiard et al., 2007)(Vieira et al., 2019), lo que en modelos de mamífero generaría neoplasias aberrantes, no extraña que la regulación de estas vías no sea tan estricta y puedan potenciarse en las primeras horas luego de un insulto.

Es importante destacar que para la muestra de 1 y 1.5 horas la distinción entre poblaciones regenerativas y control no fue tan amplia, habiendo los menos miRNAs diferencialmente expresados entre 0 y 1 horas (3 y 10 miRNAs, respectivamente), lo que lleva a suponer que también existe una regulación temporal de la expresión de miRNAs.

Para las condiciones 3 y 6 horas, donde ya se ha mencionado con anterioridad que destaca el programa de diferenciación tardío, también aumentan los miRNAs expresados a 11 y 27 miRNAs, respectivamente. En este estadio de la regeneración comienza la expresión

de miR-4492, miR-200, miR-301b-3p que actúan suprimiendo tumores y han estado relacionados a diversas formas de cáncer en humanos. Esto nuevamente se relaciona con el punto anterior en donde se destaca la resistencia del ajolote a generar neoplasias, teratomas, etc. Por lo que queda establecido entre las 6 primeras horas de regeneración del ajolote hay una fuerte inducción de la proliferación celular promovida por la sub regulación de miRNAs que actuarían suprimiendo tumores y favoreciendo la expresión de miRNAs cuyos blancos sean genes de alta inducción de la proliferación y el ciclo celular.

8.4 Análisis de las proteínas diferencialmente expresadas

El análisis de enriquecimiento de un conjunto de genes (GSEA) tanto en las bibliotecas de *gene ontology* como *KEGG* arroja información sobre procesos biológicos, funciones moleculares, compartimentos celulares y vías sobrerrepresentadas con los datos de las proteínas analizadas. Iniciando con las proteínas exclusivas, se tienen términos de “unión a filamentos de actina”, “constituyentes estructurales del músculo”, “unión a proteínas de la familia de las neurexinas” e “interacción ECM-receptor” que involucran proteínas como tropomiosina (TPM4), miomesina (MYOM2), espectrina B (SPTBN1), adducina (ADD3), sinaptotagmina 2 (SYTL2) supervillina (SVIL), entre otras. En conjunto, estas proteínas participan en polimerizar, cortar y madurar filamentos de actina, generar interconexión entre proteínas de andamiaje con el citoesqueleto que en un contexto de respuesta inicial al daño causado por la lesión estarían generando plasticidad celular, necesaria para mantener la morfología neuronal, movilidad celular, transporte intracelular y, específicamente, estabilizar las fibra axonales afectadas, además de favorecer la supervivencia de las neuronas comprometidas. Lo anterior se puede lograr al sobreexpresar proteínas involucradas en el transporte a través de distintos componentes de microtúbulos, actinomiocina, etc. que es requerido para la deposición de moléculas neurotróficas o de supervivencia en el cono axonal que estén cerca del área afectada (Leite et al., 2021). De relevancia es que proteínas como SYTL2 y AKAP12 que aparecen representadas a las 1.5 horas (Fig. Suplementaria 4), están relacionadas con distintas formas de cáncer de ovario, próstata y colon (Sung et al., 2016). Particularmente, AKAP12 es una proteína de andamiaje que tiene un papel como supresor de tumores por su supuesta participación en la represión de la actividad de la telomerasa; su subexpresión está relacionada con una prognosis pobre en diversos tipos de cáncer en

humanos, además de que su actividad está relacionada con la modificación de la matriz extracelular al favorecer la activación de macrófagos antiinflamatorios (M2) que la harán más compacta y permisible a la remodelación del tejido (Xuan et al., 2018). Este último atributo podría ser la explicación de que esta proteína tenga expresión incrementada a 1.5hrs en comparación con el control. Entre los términos enriquecidos en la biblioteca KEGG, están “esclerosis lateral amiotrófica” y “enfermedad de Huntington”, entre otras. Cabe clarificar que estos términos de enfermedades reportadas en humano están enriquecidos porque el análisis de proteínas se realizó buscando ortólogos en humano de las proteínas de ajolote y no porque padezcan este tipo de afecciones. Las proteínas involucradas en estos términos son la clatrina (CLTC), una subunidad del complejo proteico adaptador *Ap-2* (AP2A2), cadenas pesadas de dineína (DNAH1 y DNAH2), matrín 3 (MATR3) y proteínas involucradas en proteólisis como UBQLN4 y PSMD7. En las células eucariotas existe un mecanismo por el cual se realiza endocitosis de proteínas transmembranales y ligandos (entre otros) a través de la formación de vesículas recubiertas con clatrina, que activan múltiples vías en la célula o se transportan hacia lisosomas para su degradación; la formación de estas vesículas es dependiente de la actividad de AP-2, filamentos de actina ($ACT\beta$) y proteínas relacionadas a actina (ARP2/3) (Kaksonen & Roux, 2018) que también han sido descritas como diferencialmente expresadas en este análisis. Por lo anterior, es posible que ocurra formación de vesículas intracelulares durante las primeras seis horas después de un daño al telencéfalo del ajolote promoviendo proteólisis de proteínas mal plegadas y activación de señalización intracelulares, entre otras.

Dentro de las proteínas cuantificadas los términos que más cambian y más se describen son aquellos relacionados con la dinámica del citoesqueleto y adhesión celular como “unión a filamentos de actina”, “unión a cadherinas”, “unión a vinculinas”, “unión a filamentos intermedios”, “unión a gamma tubulina”, “unión a miosina” y “unión a espectrina”. Proteínas como miosina 18 (MYO18A), dematina (DMTN), cadena pesada de miosina (MYH1), formina (FHOD3), neurocan (NCAN), distrofina (DMD), espectrina B (SPTBN5), sinemina (SYNM), proteínas relacionada a actina 2 (ARPC2) y drebrina (DBNL) conforman estas categorías y se comparten entre algunas de ellas. La interacción de estos términos nuevamente resalta la sobreexpresión de proteínas moduladoras de actina, que

están fuertemente relacionadas a la degeneración axonal y a condiciones neurodegenerativas. Por ejemplo, se sabe que en las neuronas existe un componente estructural llamado **esqueleto periódico membranal (membrane periodic skeleton, MPS)** compuesto por anillos de actina espaciados regularmente por tetrámeros de espectrina, donde también participa la aduccina para fomentar la unión lateral de actina y espectrina; también se han reportado redes de actinmiosina (formas no musculares de miosina) involucradas con esta estructura (Costa et al., 2020; Xu et al., 2013). La función de la MPS es controlar el diámetro axonal con posibles implicaciones en la expansión o contracción axonal y particularmente, se ha señalado su participación en el colapso del cono de crecimiento axonal -estructura que en un contexto de lesión permitiría al axón redirigir su trayectoria a nuevos blancos que favorezcan su supervivencia a través de factores tróficos-; se demostró que si a través de tratamiento farmacológico se estabilizaba la MPS, el axón no se fragmenta luego de la privación de factores tróficos, con lo que se concluye que la destrucción de la MPS es requerida para la muerte axonal (Unsain et al., 2018). En el caso del ajolote, dadas las proteínas relacionadas a la MPS, quedaría en evidencia que luego de un insulto que comprometa la integridad del axón, se estaría promoviendo la supervivencia y la reconexión de axones lesionados a otros sitios por conducto de la estabilización del citoesqueleto y de la dinámica de actina.

Por otro lado, hay proteínas involucradas con la dinámica de cromatina (CHD6, EHMT2), metilación de ADN (MECP2) y unión a correguladores de la transcripción (ZNF618) como parte de los términos enriquecidos en la Fig 10 y Fig. Suplementaria 5. Se ha reportado que CHD6 puede ser un factor de respuesta a daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) vía mecanismos no bien especificados, pero relacionados a la posible actividad remodeladora de la cromatina en el sitio donde ocurrió daño al ADN o por la regulación transcripcional de la respuesta antioxidante (Moore et al., 2019). Además, se ha demostrado que exacerba el estrés oxidativo cuando está abatida, por lo que su subexpresión en el cerebro del ajolote en los tiempos tempranos de regeneración puede estar orientada a aumentar los niveles de ROS en la región del daño, situación previamente reportada como necesaria para la inducción de la regeneración de cola del ajolote y el cerebro del tritón. En el primer caso, la actividad de ROS está involucrada en la formación del blastema, pues abatir su producción inhibiendo a las NOX (NAPDH oxidasas) produce una cola de menor tamaño

a causa de una menor proliferación celular, que puede ser rescatada con la administración exógena de ROS como peróxido de hidrógeno H_2O_2 ; este rescate, a su vez, ocurre por un mecanismo de proliferación celular compensatoria ante la señal de caspasa-3 que liberan las células que están muriendo a causa de la acumulación de ROS (B et al., 2021). Para el segundo caso es importante mencionar que en el cerebro del tritón también hay glía radial quiescente revistiendo los ventrículos cerebrales que se enciende luego de un insulto. Por ejemplo, al realizar una lesión química con 6- hidroxidopamina (6-OHDA) en el mesencéfalo del tritón se abatió la población neuronal dopaminérgica, estímulo que desencadenó la neurogénesis y la restitución de la población afectada por parte de la glía radial; inicialmente se propuso que la dopamina era el principal regulador de la síntesis de nuevas neuronas dopaminérgicas (Berg et al., 2011). Sin embargo, se probó que al inhibir la producción de ROS después de la lesión, la activación de la glía radial no ocurría y la restitución de la población dopaminérgica no tenía lugar (Hameed et al., 2015). Lo anterior prueba que en un contexto global de la regeneración, se requiere de ROS para estimular el reingreso al ciclo celular de las poblaciones encargadas de lograrlo y que su inhibición mantiene a la endimoglia en un estado quiescente, por lo que es necesario mantener subexpresados a sus reguladores de la respuesta a ROS como CHD6. La subexpresión de EHMT2 y MECP2 está relacionada con la accesibilidad a la cromatina y al favorecimiento de la transcripción, pues la primera es una metiltransferasa que actúa sobre la histona 3 para generar la marca H3K9me2, señal de represión transcripcional. MECP2 por otro lado, es una proteína de unión a sitios CpG metilados con funciones de activación o represión transcripcional dependiendo de las proteínas accesorias con las que se encuentre; su subexpresión está relacionada con mayor acetilación de histonas y con el alivio de la represión que genera sobre el factor neurotrófico BDNF, que está involucrado en la supervivencia neuronal y en la reconexión axonal (Chen et al., 2003). En el futuro será importante descifrar la interconexión de MECP2 y la histona *linker* H1 en el ajolote, pues se ha reportado que MECP2 compite y desplaza a H1 (también subexpresada en este análisis) en sitios del ADN metilados, consistente con que en los núcleos neuronales hay 3 veces más MECP2 y 50% menos H1 que en otras células de mamífero (Guy et al., 2011), pudiendo existir una participación más relevante de MECP2 en el epigenoma neuronal que solo regular la transcripción.

8.4 Integración de la correspondencia miRNA- Proteína diferencialmente expresados

También en las Figuras suplementarias 7 y 8 podemos observar los términos sobre representados y el gráfico de interacción entre las 171 proteínas cuantificadas que pueden ser blanco de miRNAs DE encontrados en nuestro análisis.

En la tabla 7 se pueden ver en la última columna el número de proteínas que fueron diferencialmente expresadas en nuestro análisis y que resultan estar siendo blanco de alguno de los miRNAs también diferencialmente expresados. A manera de ejemplo, se puede destacar el caso del hsa-miR-199a-5p, que es uno de los 3 miRNAs diferencialmente expresados para la condición 0vs 1hr con un $\log_2FC = -2.77$. Este miRNA tiene 478 blancos posibles validados según la paquetería MultiMIR de R, de ellos hay únicamente uno diferencialmente expresado identificado para la misma condición en nuestro análisis de proteínas el cual es SORL1 (Sortilin related receptor 1) con un $\log_2FC = 3.51$. Interesante es destacar que la proteína de SORL1 permanece sobreexpresada para las condiciones 0.5, 1 y 6 horas, corroborando el modelo de correlación que existe entre el aumento de expresión de una proteína al disminuir la cantidad miRNA que estaría inhibiendo la transcripción. Esta proteína está relacionada con la enfermedad de Alzheimer al ser un receptor involucrado en el tráfico de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) a compartimentos intracelulares dentro de la neurona para su degradación, evitando su rompimiento proteolítico y consecuente generación de depósitos de β -amiloide en el citoplasma, que es la causa de la neurodegeneración en este padecimiento (Zollo et al., 2017). Por lo anterior, se propone que el contexto regenerativo en el ajolote podría estar involucrada en un aumento del tráfico proteico dentro de la neurona para mantener la homeostasis e impedir que la neurona acumule subproductos letales.

En un punto anterior de esta discusión se mencionó el papel de AKAP12 en la la progresión de distintas formas de cáncer en humano. Esta proteína únicamente se encontró en la condición de 1.5hrs; nuevamente se puede hacer hincapié en el hecho de que su ausencia en otras condiciones experimentales se deba a error de manipulación y/o procesamiento durante la espectrometría de masas, pero un punto a considerar es la regulación que existe de esta proteína por parte del miR-103, el cual estuvo sobre expresado en la condición REG vs CTL con un $\log_2FC = 1.91$. Se ha demostrado que AKAP12 tiene un papel como inhibidor de tumores, y que

su silenciamiento por parte del miR-103 promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis en carcinoma hepatocelular (W. Xia et al., 2016), manteniendo la hipótesis de que el programa de expresión de los miRNAs DE va orientado a silenciar genes supresores de tumores y promover la proliferación. Un último ejemplo se puede sentar bajo la base de la regulación que existe entre el miR-183-5p que está sobre expresado con un $\log_2FC=4.25$ para la condición de 6 horas con uno de sus blancos TET2 que tiene un $\log_2FC=-2.91$ para la misma condición, Este gen está involucrado en la desmetilación del ADN al catalizar el paso de entre 5-metil citocina (5mC) a 5-hidroximetilcitocina (5hmC) una firma epigenética que también puede ser leída por proteínas *readers* como MECP2 y UHFR2. Sin embargo, su subexpresión está completamente ligada a la progresión de cáncer en el sistema hematopoyético al expandir la población progenitora hematopoyética (Jiang, 2020). En el contexto de respuesta al daño, su subregulación puede estar completamente ligada a la amplificación de dicha población y su consecuente diferenciación hacia linajes monocíticos/macrófagos que ayuden a la respuesta inflamatoria y de limpieza de *debriss* celular inicial.

9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se procesaron datos crudos de secuenciación de micro RNAs (miRNAs) y datos de abundancia de proteínas obtenidos por espectrometría de masas generados con muestras de cerebro lesionado de ajolotes a distintos tiempos de regeneración dentro de las seis horas posteriores al daño. De estos análisis se encontraron 32 miRNAs diferencialmente expresados comparando todas las condiciones temporales agrupadas contra el control sin lesionar. Estos miRNAs tienen blancos potenciales relacionados con mecanismos de autofagia, proteólisis y modificaciones de la cromatina e histonas, que se propone sientan un programa previo a la regeneración orientado a consumir el *debriss* celular y subproductos letales que se puedan acumular a causa de la lesión, por lo que al deshacerse de ellos se favorecería la supervivencia de las poblaciones celulares que permanecen en el sitio de la lesión. Por otro lado, las proteínas diferencialmente expresadas procesadas en las bibliotecas de ontología genética y vías sobre-representadas enriquecen términos relacionados a la plasticidad celular, estabilización del citoesqueleto, transporte a través de microtúbulos, así como interacción de la matriz extracelular con la célula. Estas proteínas

también se proponen como participes en la supervivencia de los diversos tipos neuronales que yacen en el sitio de la lesión y que se supone encienden un programa de expresión proteico inicial orientado a la supervivencia al estabilizar fibras axonales al redirigirlas a nuevos blancos a los cuáles el como axonal se vuelve más sensible.

Sin embargo, existen algunas limitaciones en cuanto a la interpretación de los resultados reportados. Esto se ve causado por la utilización de un genoma de humano para alinear los miRNAs secuenciados y para encontrar ortólogos de las proteínas de ajolote. Sin embargo, los parámetros para la detección de secuencias de miRNAs y proteínas como: porcentaje de identidad, longitud de secuencias exactas, así como el índice de *mismatches* permitidos se manejaron de manera estricta. En el futuro será importante trabajar sobre genomas de ajolote anotados con buena calidad, esperando que se sienten las bases para comenzar a homologar genes y proteínas entre ambas especies en términos de ontología genética.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar validaciones experimentales de la expresión diferencial de mRNAs, miRNAs y proteínas en el cerebro lesionado a través de hibridaciones *in situ*, qRT-PCR o western blot, respectivamente.
- También se pueden realizar pérdida de función de miRNAs candidato durante la regeneración cerebral del ajolote a través de esponjas de miRNAs o *antagomirs*, que son oligonucleótidos que captan al miRNA e impiden que inhiba a sus mRNA blancos. Esto podría llevarnos a conocer el fenotipo de regeneración truncado y cuál es la población celular que resiente la inhibición de dichos miRNAs, poniendo particular atención a la endimoglia.
- Re-analizar los datos crudos de secuenciación de mRNA para incluir comparativas entre cada condición temporal contra el control, corrección por efecto de lote y parámetros del nivel de inducción menos astringentes

($\log_2FC=1$) que permitan identificar un mayor número de genes cuya expresión se ve alterada luego de la lesión al telencéfalo.

- Realizar experimentos de pérdida de función sobre proteínas encontradas como diferencialmente expresadas usando morfolinós para validar su posible participación en la regeneración cerebral del ajolote. Esperando identificar alguna que acelere este proceso que pueda ser evaluada en cultivos celulares de mamífero buscando encontrar mayor tasa de proliferación o supervivencia de estos cultivos.
- Extender las condiciones temporales para extraer tejido de muestras en tiempos mayores a un día, con la finalidad de secuenciar y/o analizar proteínas a través de espectrometría de masas. Con esto se buscará identificar cuándo ocurre la transición del programa de respuesta inicial al daño hacia el programa regenerativo.
- Alinear los mRNAs, miRNAs y proteínas con los arreglos transcryptómicos más recientes que cuentan con una mayor y mejor anotación para en el futuro identificar ortólogos de humano con mayor confiabilidad.
- Validar la suposición del establecimiento de un perfil de supervivencia neuronal al realizar un marcaje axonal *in vivo* donde se pueda validar qué ocurre después de la lesión con los procesos neurales truncados, esperando que se estabilicen y se reencuentren con otros blancos.

11. REFERENCIAS

- Adams, K. L., & Gallo, V. (2018). The diversity and disparity of the glial scar. In *Nature Neuroscience* (Vol. 21, Issue 1, pp. 9–15). <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0033-9>
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife*, 4(AUGUST2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Albors, A. R., Tazaki, A., Rost, F., Nowoshilow, S., Chara, O., & Tanaka, E. M. (2015). Planar cell polarity-mediated induction of neural stem cell expansion during axolotl spinal cord regeneration. *ELife*, 4(NOVEMBER2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.10230>
- Amamoto, R., Huerta, V. G. L., Takahashi, E., Dai, G., Grant, A. K., Fu, Z., & Arlotta, P. (2016). Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *ELife*, 5(MAY2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.13998>
- B, C. M., J, Z. C., & JP, D. (2021). Hydrogen peroxide is necessary during tail regeneration in juvenile axolotl. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. <https://doi.org/10.1002/DVDY.386>
- Barrero, M. J., & Belmonte, J. C. I. (2013). Polycomb complex recruitment in pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology* 2013 15:4, 15(4), 348–350. <https://doi.org/10.1038/ncb2723>
- Berg, D. A., Kirkham, M., Wang, H., Frisé, J., & Simon, A. (2011). Dopamine controls neurogenesis in the adult salamander midbrain in homeostasis and during regeneration of dopamine neurons. *Cell Stem Cell*, 8(4), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.001>
- Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M. S. Y., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Landén, M., Druid, H., Spalding, K. L., & Frisé, J. (2012). The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron*, 74(4), 634–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.030>
- Blanquie, O., & Bradke, F. (2018). Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 60–69. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2018.02.024>
- Boilly, B., & Albert, P. (1988). Blastema cell proliferation in vitro: effects of limb amputation on the mitogenic activity of spinal cord extracts. *Biology of the Cell*, 62(2), 183–187. <https://doi.org/10.1111/j.1768-322X.1988.tb00720.x>
- Boo, L., Ho, W. Y., Ali, N. M., Yeap, S. K., Ky, H., Chan, K. G., Yin, W. F., Satharasinghe, D. A., Liew, W. C., Tan, S. W., Ong, H. K., & Cheong, S. K. (2016). MiRNA transcriptome profiling of spheroid-enriched cells with cancer stem cell properties in human breast MCF-7 cell line. *International Journal of Biological Sciences*, 12(4), 427–445. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12777>
- Bryant, D. M., Sousounis, K., Farkas, J. E., Bryant, S., Thao, N., Guzikowski, A. R., Monaghan, J. R., Levin, M., & 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>
- 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., & 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>
- Chen, W. G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A. E., Griffith, E. C., Jaenisch, R., & Greenberg, M. E. (2003). Derepression of BDNF Transcription Involves Calcium-Dependent Phosphorylation of MeCP2. *Science*, *302*(5646), 885–889. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1086446/SUPPL_FILE/CHENW.PDF
- Christen, B., Beck, C. W., Lombardo, A., & Slack, J. M. W. (2003). Regeneration-specific expression pattern of three posterior Hox genes. *Developmental Dynamics*, *226*(2), 349–355. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10231>
- Costa, A. R., Sousa, S. C., Pinto-Costa, R., Mateus, J. C., Lopes, C. D. F., Costa, A. C., Rosa, D., Machado, D., Pajuelo, L., Wang, X., Zhou, F. Q., Pereira, A. J., Sampaio, P., Rubinstein, B. Y., Pinto, I. M., Lampe, M., Aguiar, P., & Sousa, M. M. (2020). The membrane periodic skeleton is an actomyosin network that regulates axonal diameter and conduction. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.55471>
- Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J., & Gharagouzlo, E. (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, *13*(2), 48–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28824341>
- Demircan, T., Sibai, M., Erhan, M., Avcı, Glu B, A., Altuntasç, A., & Ovezmyradov, G. (2020). *Gene xxx (xxxx) xxx The first report on circulating microRNAs at Pre-and Post-metamorphic stages of axolotls*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145258>
- Denis, J. F., Sader, F., Gatien, S., Villiard, É., Philip, A., & Roy, S. (2016). Activation of Smad2 but not Smad3 is required to mediate TGF- β signaling during axolotl limb regeneration. *Development (Cambridge)*, *143*(19), 3481–3490. <https://doi.org/10.1242/dev.131466>
- Diaz Quiroz, J. F., Tsai, E., Coyle, M., Sehm, T., & Echeverri, K. (2014). Precise control of miR-125b levels is required to create a regeneration-permissive environment after spinal cord injury: A cross-species comparison between salamander and rat. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *7*(6), 601–611. <https://doi.org/10.1242/dmm.014837>
- Erickson, J. R., & Echeverri, K. (2015). In vivo modulation and quantification of microRNAs during axolotl tail regeneration. *Methods in Molecular Biology*, *1290*, 159–167. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2495-0_13
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., & Frisé, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, *156*(5), 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.044>
- Evans, T., Johnson, A. D., & Loose, M. (2018). Virtual Genome Walking across the 32 Gb *Ambystoma mexicanum* genome; Assembling gene models and intronic sequence. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19128-6>

- Fan, Y., Li, Y., Zhu, Y., Dai, G., Wu, D., Gao, Z., Zhang, L., & Xu, D. (2021). miR-301b-3p Regulates Breast Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Targeting NR3C2. *Journal of Oncology*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/8810517>
- Farkas, J. E., & Monaghan, J. R. (2015). Housing and maintenance of ambystoma mexicanum, the mexican axolotl. *Methods in Molecular Biology*, 1290, 27–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2495-0_3
- Feng, F., Liu, H., Chen, A., Xia, Q., Zhao, Y., Jin, X., & Huang, J. (2019). miR-148-3p and miR-152-3p synergistically regulate prostate cancer progression via repressing KLF4. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 17228–17239. <https://doi.org/10.1002/jcb.28984>
- Fort, R. S., Mathó, C., Oliveira-Rizzo, C., Garat, B., Sotelo-Silveira, J. R., & Duhagon, M. A. (2018). An integrated view of the role of miR-130b/301b miRNA cluster in prostate cancer. *Experimental Hematology and Oncology*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40164-018-0102-0>
- Gearhart, M. D., Erickson, J. R., Walsh, A., & Echeverri, K. (2015). Identification of conserved and novel micrnas during tail regeneration in the mexican axolotl. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22046–22061. <https://doi.org/10.3390/ijms160922046>
- Georgantas, R. W., Streicher, K., Greenberg, S. A., Greenlees, L. M., Zhu, W., Brohawn, P. Z., Higgs, B. W., Czapiga, M., Morehouse, C. A., Amato, A., Richman, L., Jallal, B., Yao, Y., & Ranade, K. (2014). Inhibition of myogenic microRNAs 1, 133, and 206 by inflammatory cytokines links inflammation and muscle degeneration in adult inflammatory myopathies. *Arthritis and Rheumatology*, 66(4), 1022–1033. <https://doi.org/10.1002/art.38292>
- Grandel, H., & Brand, M. (2013). Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. In *Development Genes and Evolution* (Vol. 223, Issues 1–2, pp. 131–147). <https://doi.org/10.1007/s00427-012-0425-5>
- Guy, J., Cheval, H., Selfridge, J., & Bird, A. (2011). The Role of MeCP2 in the Brain. <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Cellbio-092910-154121>, 27, 631–652. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-092910-154121>
- Hameed, L. S., Berg, D. A., Belnoue, L., Jensen, L. D., Cao, Y., & Simon, A. (2015). Environmental changes in oxygen tension reveal ROS-dependent neurogenesis and regeneration in the adult newt brain. *ELife*, 4(OCTOBER2015). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.08422>
- Han, Y., Kuang, Y., Xue, X., Guo, X., Li, P., Wang, X., Guo, X., Yuan, B., Zhi, Q., & Zhao, H. (2014). NLK, a novel target of miR-199a-3p, functions as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 68(5), 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.05.003>
- Hsu, M. N., Chang, Y. H., Truong, V. A., Lai, P. L., Nguyen, T. K. N., & Hu, Y. C. (2019). CRISPR technologies for stem cell engineering and regenerative medicine. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 8, p. 107447). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107447>
- Hui, S. P., Monaghan, J. R., Voss, S. R., & Ghosh, S. (2013). Expression pattern of Nogo-A, MAG, and NgR in regenerating urodele spinal cord. *Developmental Dynamics*, 242(7), 847–860.

<https://doi.org/10.1002/dvdy.23976>

- Jiang, S. (2020). Tet2 at the interface between cancer and immunity. *Communications Biology* 2020 3:1, 3(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01391-5>
- Johnson, K., Bateman, J., DiTommaso, T., Wong, A. Y., & Whited, J. L. (2018). Systemic cell cycle activation is induced following complex tissue injury in axolotl. *Developmental Biology*, 433(2), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.010>
- Joven, A., & Simon, A. (2018). Homeostatic and regenerative neurogenesis in salamanders. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 170, pp. 81–98). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.04.006>
- Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 19:5, 19(5), 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>
- Kefalopoulou, Z., Politis, M., Piccini, P., Mencacci, N., Bhatia, K., Jahanshahi, M., Widner, H., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., Limousin, P., Quinn, N., & Foltynie, T. (2014). Long-term Clinical Outcome of Fetal Cell Transplantation for Parkinson Disease Two Case Reports. *JAMA Neurology*, 71(1), 83. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2013.4749>
- Kirkham, M., Hameed, L. S., Berg, D. A., Wang, H., & Simon, A. (2014). *Stem Cell Reports Article Progenitor Cell Dynamics in the Newt Telencephalon during Homeostasis and Neuronal Regeneration*. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.018>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85, 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Koshizuka, K., Hanazawa, T., Kikkawa, N., Arai, T., Okato, A., Kurozumi, A., Kato, M., Katada, K., Okamoto, Y., & Seki, N. (2017). Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer. *Cancer Science*, 108(8), 1681–1692. <https://doi.org/10.1111/cas.13298>
- Kumar, D., Bansal, G., Narang, A., Basak, T., Abbas, T., & Dash, D. (2016). Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. *Proteomics*, 16, 2533–2544. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600140>
- Leite, S. C., Pinto-Costa, R., & Sousa, M. M. (2021). Actin dynamics in the growth cone: a key player in axon regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, 69, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.CONB.2020.11.015>
- Londono, R., Sun, A. X., Tuan, R. S., & Lozito, T. P. (2018). TISSUE REPAIR AND EPIMORPHIC REGENERATION: AN OVERVIEW HHS Public Access. *Curr Pathobiol Rep*, 6(1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/s40139-018-0161-2>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8>
- Maden, M., Manwell, L. A., & Ormerod, B. K. (2013). Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural Development*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1749->

- Mao, A. S., & Mooney, D. J. (2015). Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(47), 14452–14459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>
- Mccusker, C., & Gardiner, D. M. (2011). Fax +41 61 306 12 34 E-Mail karger@karger.ch Regenerative and Technological Section / Mini-Review The Axolotl Model for Regeneration and Aging Research: A Mini-Review. *Gerontology*, *57*, 565–571. <https://doi.org/10.1159/000323761>
- Mchedlishvili, L., Epperlein, H. H., Telzerow, A., & Tanaka, E. M. (2007). A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors. *Development*, *134*(11), 2083–2093. <https://doi.org/10.1242/dev.02852>
- Mchedlishvili, L., Mazurov, V., Grassme, K. S., Goehler, K., Robl, B., Tazaki, A., Roensch, K., Duemmler, A., & Tanaka, E. M. (2012). Reconstitution of the central and peripheral nervous system during salamander tail regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(34), E2258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116738109>
- Monaghan, J. R., Stier, A. C., Michonneau, F., Smith, M. D., Pasch, B., Maden, M., & Seifert, A. W. (2014). Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration*, *1*(1), 2–14. <https://doi.org/10.1002/reg2.8>
- Monaghan, J. R., Walker, J. A., Page, R. B., Putta, S., Beachy, C. K., & Voss, S. R. (2007). Early gene expression during natural spinal cord regeneration in the salamander *Ambystoma mexicanum*. *Journal of Neurochemistry*, *101*(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04344.x>
- Moore, S., Berger, N. D., Luijsterburg, M. S., Pielt, C. G., Stanley, F. K. T., Schröder, C. U., Fang, S., Chan, J. A., Schriemer, D. C., Nagel, Z. D., van Attikum, H., & Goodarzi, A. A. (2019). The CHD6 chromatin remodeler is an oxidative DNA damage response factor. *Nature Communications* *2019 10:1*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08111-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., & 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>
- Nowoshilow, S., & Tanaka, E. M. (2020). Introducing www.axolotl-omics.org – an integrated -omics data portal for the axolotl research community. In *Experimental Cell Research* (Vol. 394, Issue 1, p. 112143). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112143>
- Oveissi, F., Tavakoli, N., Minaiyan, M., Mofid, M. R., & Taheri, A. (2020). Alginate hydrogel enriched with *Ambystoma mexicanum* epidermal lipoxygenase-loaded pectin nanoparticles for enhanced wound healing. *Journal of Biomaterials Applications*, *34*(8), 1171–1187. <https://doi.org/10.1177/0885328219896704>
- Rahman, R. U., Gautam, A., Bethune, J., Sattar, A., Fiosins, M., Magruder, D. S., Capece, V., Shomroni, O., &

- Bonn, S. (2018). Oasis 2: Improved online analysis of small RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2047-z>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV007>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP616>
- Ru, Y., Kechris, K. J., Tabakoff, B., Hoffman, P., Radcliffe, R. A., Bowler, R., Mahaffey, S., Rossi, S., Calin, G. A., Bemis, L., & Theodorescu, D. (2014). The multiMiR R package and database: Integration of microRNA-target interactions along with their disease and drug associations. *Nucleic Acids Research*, 42(17). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU631>
- Sabin, K. Z., Jiang, P., Gearhart, M. D., Stewart, R., & Echeverri, K. (2019). AP-1cFos/JunB/miR-200a regulate the pro-regenerative glial cell response during axolotl spinal cord regeneration. *Communications Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0335-4>
- Sandoval-Guzmán, T., & Currie, J. D. (2018). The journey of cells through regeneration. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 55, pp. 36–41). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.05.008>
- Sandoval-Guzmán, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., Tazaki, A., Joven, A., Tanaka, E. M., & Simon, A. (2014). Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell*, 14(2), 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.007>
- Satoh, A., Cummings, G. M. C., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2010). Neurotrophic regulation of fibroblast dedifferentiation during limb skeletal regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental Biology*, 337(2), 444–457. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.11.023>
- Schweitzer, J. S., Song, B., Herrington, T. M., Park, T.-Y., Lee, N., Ko, S., Jeon, J., Cha, Y., Kim, K., Li, Q., Henchcliffe, C., Kaplitt, M., Neff, C., Rapalino, O., Seo, H., Lee, I.-H., Kim, J., Kim, T., Petsko, G. A., ... Kim, K.-S. (2020). Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 382(20), 1926. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1915872>
- Sehm, T., Sachse, C., Frenzel, C., & Echeverri, K. (2009). miR-196 is an essential early-stage regulator of tail regeneration, upstream of key spinal cord patterning events. *Developmental Biology*, 334(2), 468–480. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.008>
- Simon Andrews. (2020). Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. In *Soil* (Vol. 5, Issue 1, pp. 47–81). <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Smith, J. J., Timoshevskaya, N., Timoshevskiy, V. A., Keinath, M. C., Hardy, D., & 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>

- Soriano-Arroquia, A., McCormick, R., Molloy, A. P., McArdle, A., & Goljanek-Whysall, K. (2016). Age-related changes in miR-143-3p:Igfbp5 interactions affect muscle regeneration. *Aging Cell*, *15*(2), 361–369. <https://doi.org/10.1111/accel.12442>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, *555*(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Sosnik, J., Vieira, W. A., Webster, K. A., Siegfried, K. R., & McCusker, C. D. (2017). A new and improved algorithm for the quantification of chromatin condensation from microscopic data shows decreased chromatin condensation in regenerating axolotl limb cells. *PLOS ONE*, *12*(10), e0185292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185292>
- Stark, V. A., Facey, C. O. B., Viswanathan, V., & Boman, B. M. (2021). The Role of miRNAs, miRNA Clusters, and isomiRs in Development of Cancer Stem Cell Populations in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 1424, *22*(3), 1424. <https://doi.org/10.3390/IJMS22031424>
- Sun, A. X., Londono, R., Hudnall, M. L., Tuan, R. S., & Lozito, T. P. (2018). Differences in neural stem cell identity and differentiation capacity drive divergent regenerative outcomes in lizards and salamanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(35), E8256–E8265. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803780115>
- Sun, X., Dai, G., Yu, L., Hu, Q., Chen, J., & Guo, W. (n.d.). *miR-143-3p inhibits the proliferation, migration and invasion in osteosarcoma by targeting FOSL2 OPEN*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18739-3>
- Sung, H. Y., Han, J., Ju, W., & Ahn, J. H. (2016). Synaptotagmin-like protein 2 gene promotes the metastatic potential in ovarian cancer. *Oncology Reports*, *36*(1), 535–541. <https://doi.org/10.3892/OR.2016.4835>
- Takahashi, J. (2020). iPS cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regenerative Therapy*, *13*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.RETH.2020.06.002>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tanaka, E. M. (2016). The Molecular and Cellular Choreography of Appendage Regeneration. In *Cell* (Vol. 165, Issue 7, pp. 1598–1608). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.038>
- Tazaki, A., Tanaka, E. M., & Fei, J. F. (2017). Salamander spinal cord regeneration: The ultimate positive

- control in vertebrate spinal cord regeneration. In *Developmental Biology* (Vol. 432, Issue 1, pp. 63–71). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.034>
- The top 10 causes of death.* (n.d.). Retrieved May 13, 2020, from <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Tian, L., Cai, D., Zhuang, D., Wang, W., Wang, X., Bian, X., Xu, R., & Wu, G. (2020). miR-96-5p Regulates Proliferation, Migration, and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell Induced by Angiotensin II via Targeting NFAT5. *Journal of Vascular Research*, 57(2), 86–96. <https://doi.org/10.1159/000505457>
- Tsai, S. L., Baselga-Garriga, C., & Melton, D. A. (2019). Blastemal progenitors modulate immune signaling during early limb regeneration. *Development (Cambridge)*, 146(1). <https://doi.org/10.1242/dev.169128>
- Tu, L., Huang, Q., Fu, S., & Liu, D. (2018). Aberrantly expressed long noncoding RNAs in hypertrophic scar fibroblasts in vitro: A microarray study. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), 1917–1930. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3430>
- Unsain, N., Bordenave, M. D., Martinez, G. F., Jalil, S., Von Bilderling, C., Barabas, F. M., Masullo, L. A., Johnstone, A. D., Barker, P. A., Bisbal, M., Stefani, F. D., & Cáceres, A. O. (2018). Remodeling of the Actin/Spectrin Membrane-associated Periodic Skeleton, Growth Cone Collapse and F-Actin Decrease during Axonal Degeneration. *Scientific Reports 2018* 8:1, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21232-0>
- Urata, Y., Yamashita, W., Inoue, T., & Agata, K. (2018). Spatio-temporal neural stem cell behavior leads to both perfect and imperfect structural brain regeneration in adult newts. *Biology Open*, 7(6). <https://doi.org/10.1242/bio.033142>
- Vieira, W. A., Wells, K. M., & Mccusker, C. D. (2019). *Regenerative Section / Review Advancements to the Axolotl Model for Regeneration and Aging*. <https://doi.org/10.1159/000504294>
- Villiard, É., Brinkmann, H., Moiseeva, O., Mallette, F. A., Ferbeyre, G., & Roy, S. (2007). *Urodele p53 tolerates amino acid changes found in p53 variants linked to human cancer*. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-180>
- Voss, S. R., Epperlein, H. H., & Tanaka, E. M. (2009). *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: A versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(8), pdb.emo128. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo128>
- Walker, S. E., Sabin, K. Z., Gearhart, M. D., Yamamoto, K., & Echeverri, K. (2022). Regulation of stem cell identity by miR-200a during spinal cord regeneration. *Development (Cambridge)*, 149(3). <https://doi.org/10.1242/DEV.200033/274347>
- Wang, G., Li, Z., Tian, N., Han, L., Fu, Y., Guo, Z., & Tian, Y. (2016). MiR-148b-3p inhibits malignant biological behaviors of human glioma cells induced by high HOTAIR expression. *Oncology Letters*, 12(2), 879–886. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4743>
- Wang, H., Song, G., Chuang, H., Chiu, C., Abdelmaksoud, A., Ye, Y., & Zhao, L. (2018). Portrait of glial scar in

- neurological diseases. In *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* (Vol. 31, pp. 1–6). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/2058738418801406>
- Wang, J., He, Q., Han, C., Gu, H., Jin, L., Li, Q., Mei, Y., & Wu, M. (2012). p53-Facilitated miR-199a-3p Regulates Somatic Cell Reprogramming. *STEM CELLS*, *30*(7), 1405–1413. <https://doi.org/10.1002/stem.1121>
- Wu, C. H., Tsai, M. H., Ho, C. C., Chen, C. Y., & Lee, H. S. (2013). De novo transcriptome sequencing of axolotl blastema for identification of differentially expressed genes during limb regeneration. *BMC Genomics*, *14*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-434>
- 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., & 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>
- Xia, C., Yang, Y., Kong, F., Kong, Q., & Shan, C. (2018). MiR-143-3p inhibits the proliferation, cell migration and invasion of human breast cancer cells by modulating the expression of MAPK7. *Biochimie*, *147*, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.01.003>
- Xia, W., Ni, J., Zhuang, J., Qian, L., Wang, P., & Wang, J. (2016). MiR-103 regulates hepatocellular carcinoma growth by targeting AKAP12. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *71*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2015.11.017>
- Xu, K., Zhong, G., & Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, *339*(6118), 452–456. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1232251/SUPPL_FILE/1232251.XU.SM.NEW.PDF
- Xuan, W., Tong, W., Ke, L., Yuan, L., Ting, H. T., Feng, W. W., Jing, Q. S., Bo, X. S., Wei, L. W., Xuan, W., Tong, W., Ke, L., Yuan, L., Ting, H. T., Feng, W. W., Jing, Q. S., Bo, X. S., & Wei, L. W. (2018). The Mechanism and Influence of AKAP12 in Different Cancers. *Biomedical and Environmental Sciences*, *2018*, Vol. 31, Issue 12, Pages: 927-932, *31*(12), 927–932. <https://doi.org/10.3967/BES2018.127>
- Yokoyama, H. (2007). Initiation of limb regeneration: The critical steps for regenerative capacity. *Development, Growth & Differentiation*, *50*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00973.x>
- YONEYAMA, K., ISHIBASHI, O., KAWASE, R., KUROSE, K., & TAKESHITA, T. (2015). miR-200a, miR-200b and miR-429 Are Onco-miRs that Target the PTEN Gene in Endometrioid Endometrial Carcinoma. *Anticancer Research*, *35*(3).
- Zhang, H. Y., Li, C. H., Wang, X. C., Luo, Y. Q., Cao, X. D., & Chen, J. J. (2019). MiR-199 inhibits EMT and invasion of hepatoma cells through inhibition of Snail expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *23*(18), 7884–7891. https://doi.org/10.26355/eurrev_201909_18998
- Zheng, H., & Bai, L. (2019). Hypoxia induced microRNA-301b-3p overexpression promotes proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells by targeting LRP1B. *Experimental and Molecular Pathology*, *111*, 104301. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2019.104301>
- Zhu, W., Kuo, D., Nathanson, J., Satoh, A., Pao, G. M., Yeo, G. W., Bryant, S. V., Voss, S. R., Gardiner, D. M., &

- Hunter, T. (2012). Retrotransposon long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) is activated during salamander limb regeneration. *Development Growth and 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., & 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>
- Zollo, A., Allen, Z., Rasmussen, H. F., Iannuzzi, F., Shi, Y., Larsen, A., Maier, T. J., & Matrone, C. (2017). Sortilin-Related Receptor Expression in Human Neural Stem Cells Derived from Alzheimer's Disease Patients Carrying the APOE Epsilon 4 Allele. *Neural Plasticity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1892612>

12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Gen	Descripción	Gen	Descripción
RPLP1	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P1	ITM2B	Integral Membrane Protein 2B
ACTB	Actin Beta	JUNB	JunB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
ARC	Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein	MAP6	Microtubule Associated Protein 6
ARF5	ADP Ribosylation Factor 5	MARCKS	Myristoylated Alanine Rich Protein Kinase C Substrate
ARHGDI1B	Rho GDP Dissociation Inhibitor Beta	MSMO1	Methylsterol Monooxygenase 1
BSG	Basigin (Ok Blood Group)	NAPB	NSF Attachment Protein Beta
BTG2	BTG Anti-Proliferation Factor 2	NPY	Neuropeptide Y
C11orf96	Chromosome 11 Open Reading Frame 96	NR4A1	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1
CALY	Calcyon Neuron Specific Vesicular Protein	NSG2	Neuronal Vesicle Trafficking Associated 2
CBX4	Chromobox 4	NUP133	Nucleoporin 133
CENPV	Centromere Protein V	PFDN4	Prefoldin Subunit 4
CHCHD2	Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 2	PFN2	Profilin 2
CKMT1B	Creatine Kinase, Mitochondrial 1B	PKM	Pyruvate Kinase M1/2
COL1A1	Collagen Type I Alpha 1 Chain	PNP	Purine Nucleoside Phosphorylase
COX3	Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase III	PNRC2	Proline Rich Nuclear Receptor Coactivator 2
DLGAP1	DLG Associated Protein 1	PPP1CC	Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Gamma
DNAJC5	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C5	SRSF2	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2
FKBP1A	FKBP Prolyl Isomerase 1A	TOMM5	Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 5
HBB	Hemoglobin Subunit Beta	TPD52L1	Tumor Protein D52 Like 1
HBE1	Hemoglobin Subunit Epsilon 1	TUBB1	Tubulin Beta 1 Class VI
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase	YWHAE	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Epsilon
HSP90AB1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1		

Tabla Suplementaria 1. Lista de genes expresados diferencialmente entre todas las condiciones. Extraída de Ortega-Gurrola, A. (sin publicar).

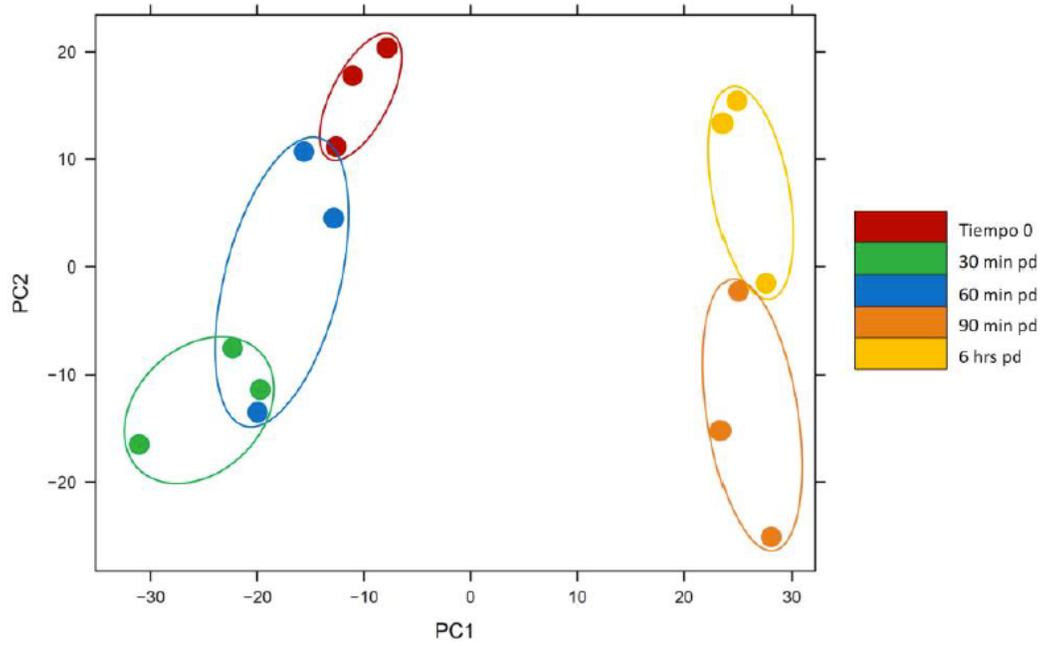


Figura Suplementaria 1. Análisis de componentes principales (PCA) para los perfiles de expresión de mRNA en donde se muestran todas las condiciones (excepto 3 horas). Extraída de Ortega-Gurrola, A. (sin publicar).

peptidePrecursor.deltaMhpPPM vs. precursor.mz

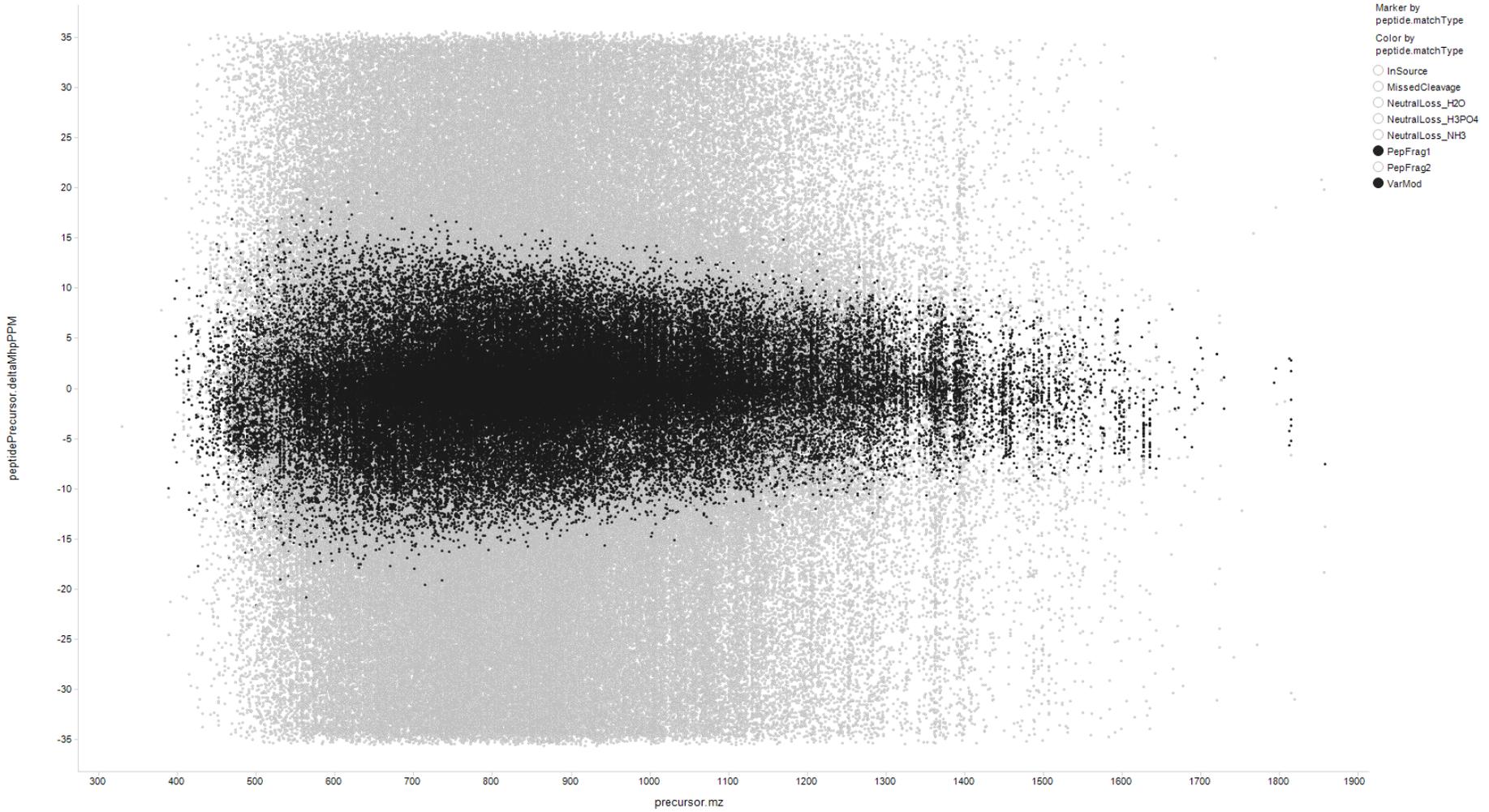


Figura Suplementaria 2. Gráfico de dispersión donde se ven graficadas las distintas clases de péptidos obtenidos por el espectrómetro de masas. En el eje x se tiene la relación masa/carga, mientras que en y se tiene el error de masas.

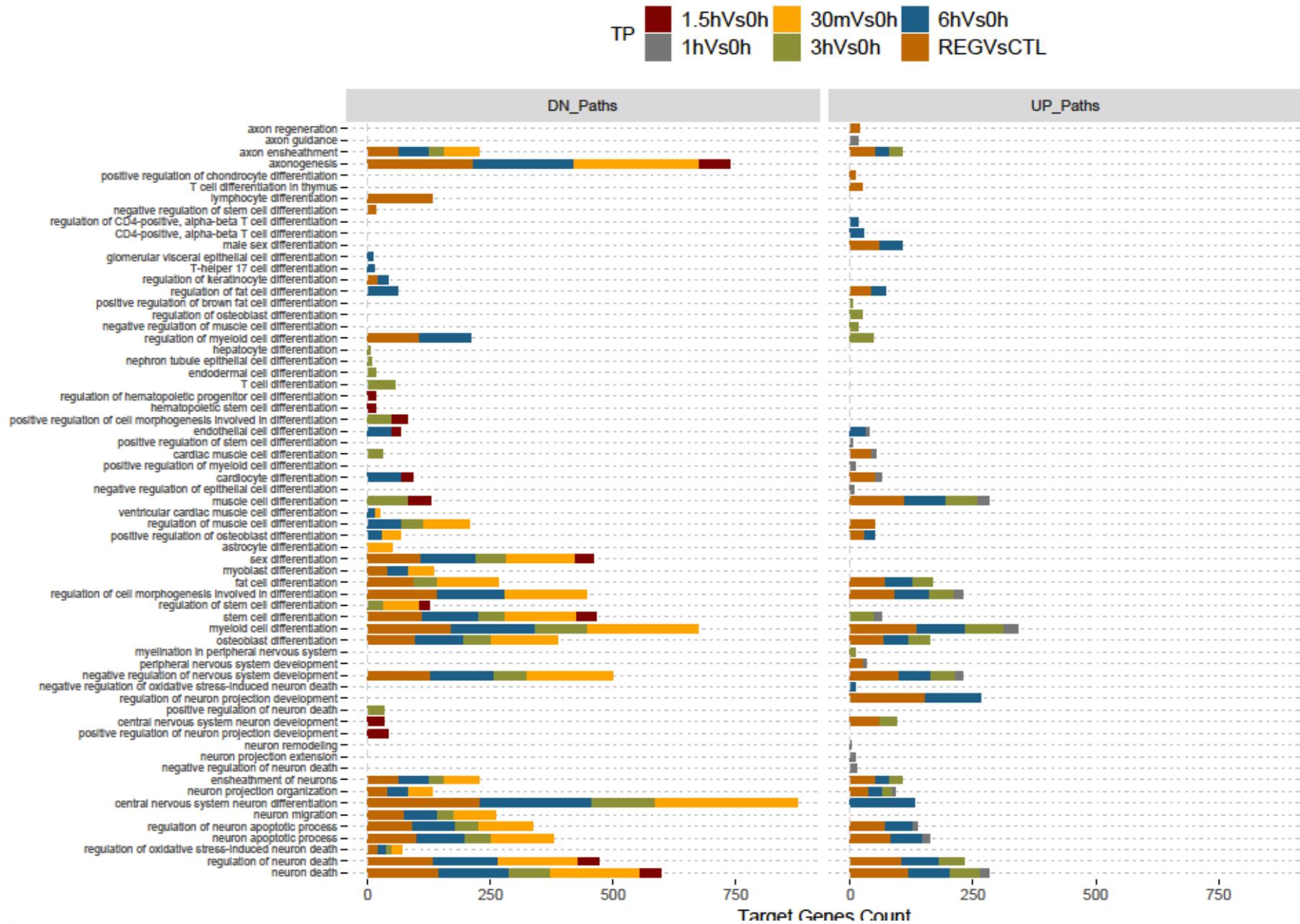


Figura Suplementaria 3. Gráfico donde se muestran a través del análisis de GO para los términos "development", "neuron", "nervous", "axon" las principales vías afectadas por los posibles mRNA blancos de los miRNAs sub expresados a la izquierda y sobre expresados a la derecha. En la parte superior de la figura también se muestra un código de color para distinguir las condiciones 0,5, 1, 1,5, 3, y 6 horas de regeneración vs el tiempo 0 y la condición regeneración (REG) vs control (CTL). Material proporcionado por Demircan, T. 2020).

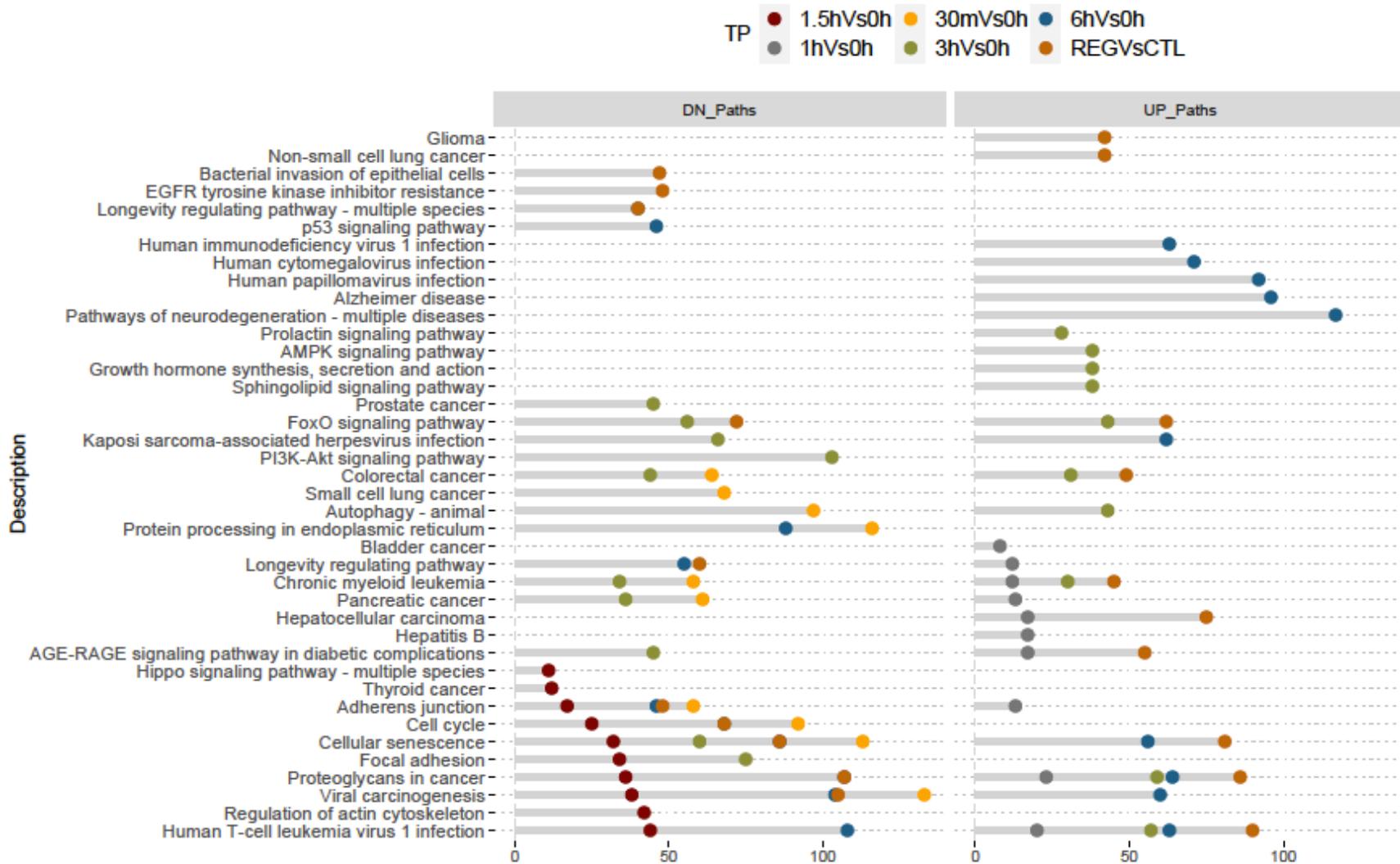


Figura Suplementaria 4. Gráfico donde se muestran las 10 principales vías afectadas por los posibles mRNA blancos de los miRNAs sub expresados a la izquierda y sobre expresados a la derecha para cada condición. En la parte superior de la figura también se muestra un código de color para distinguir las condiciones 0.5, 1, 1.5, 3, y 6 horas de regeneración vs el tiempo 0 y la condición regeneración (REG) vs control (CTL). Material proporcionado por Demircan, T. 2020).

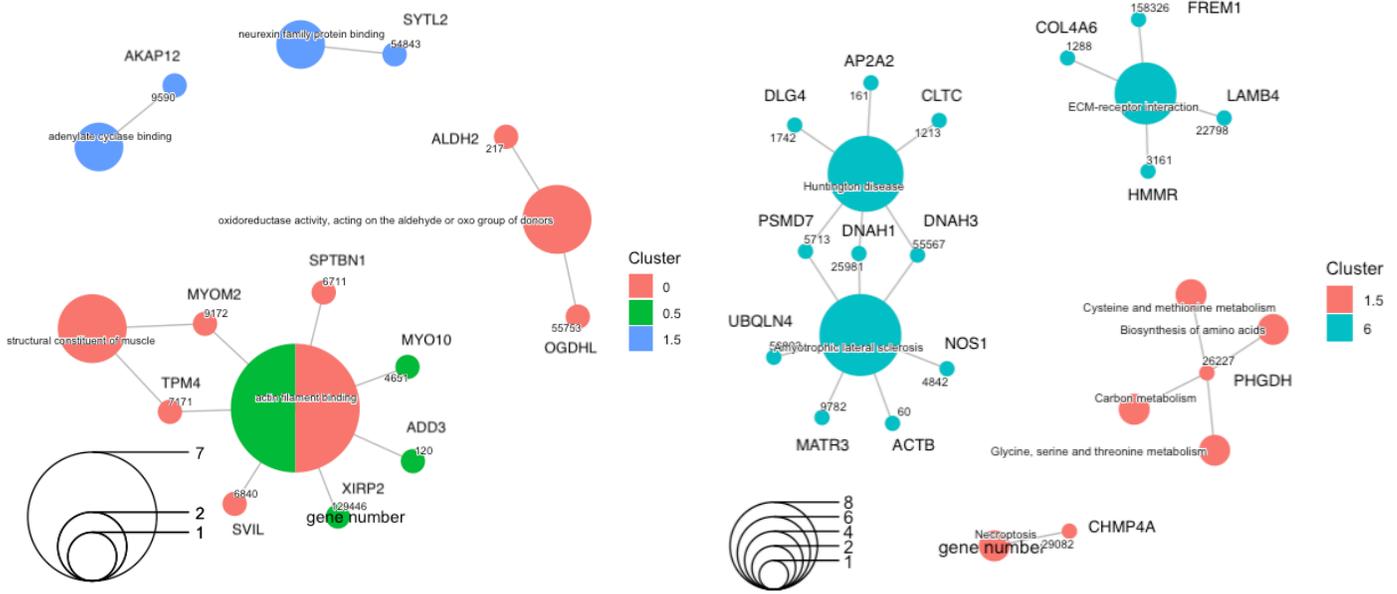


Figura Suplementaria 5. Gráfico donde se muestran las proteínas exclusivas sobre representadas a la izquierda en la biblioteca de gene ontology y a la derecha en vías sobre representadas de KEGG.

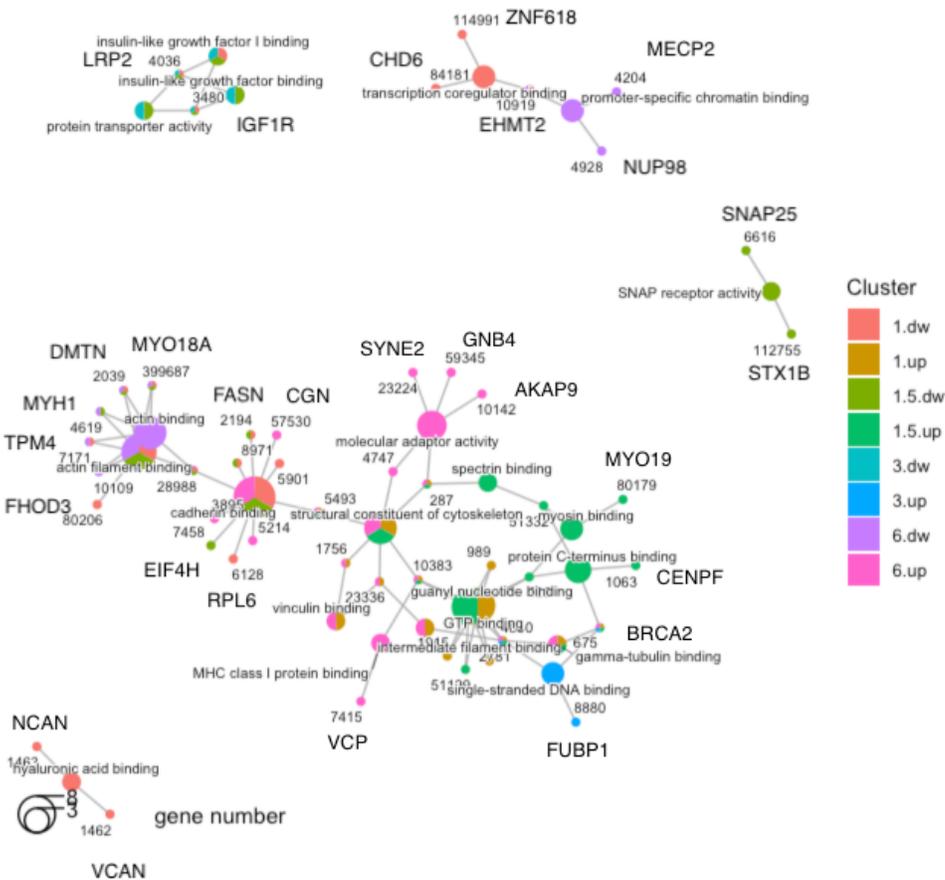


Figura Suplementaria 6. Gráfico donde se muestran las proteínas cuantificadas diferencialmente expresadas sobre representadas gene ontology.

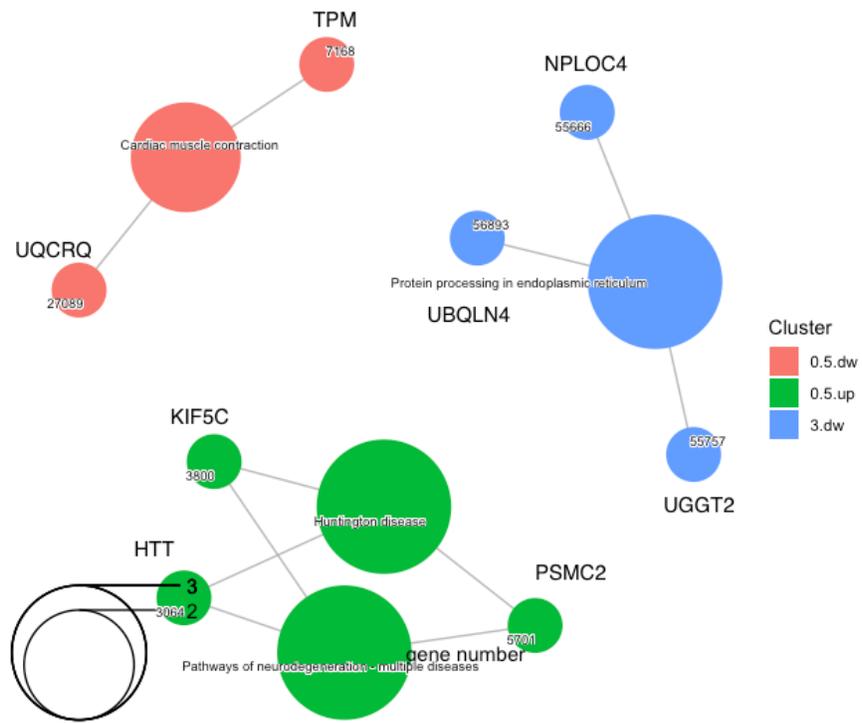


Figura Complementaria 7. Red de interacción entre las proteínas cuantificadas diferencialmente expresadas involucradas en los procesos sobre representados obtenidos en la base de datos KEGG.

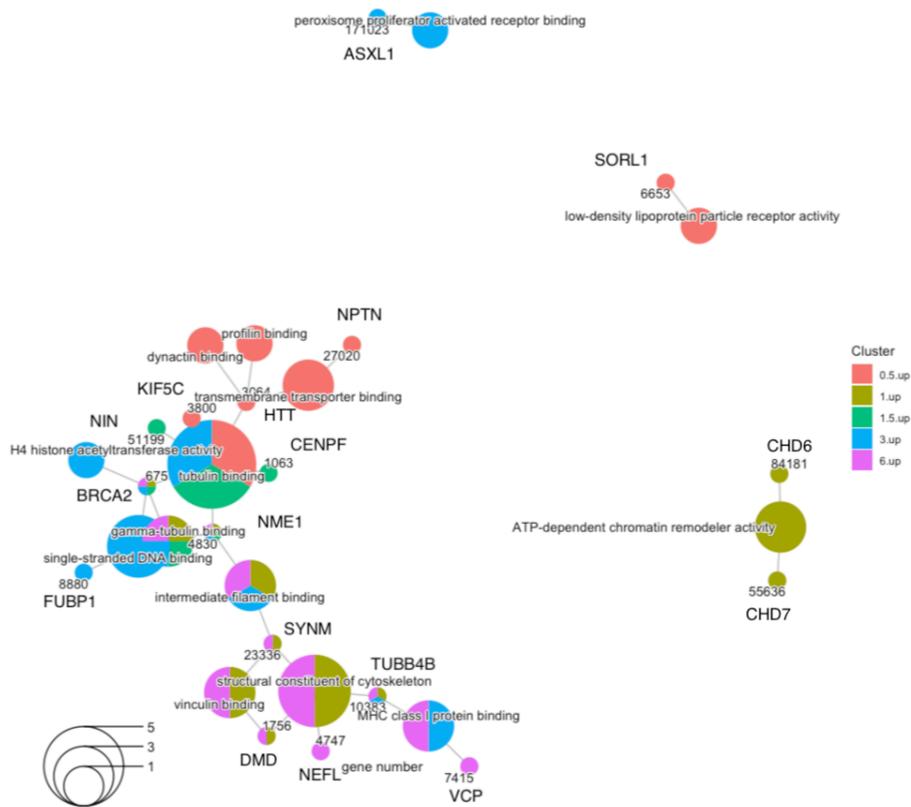


Figura Complementaria 8. Red de interacción de los términos sobre representados para las proteínas diferencialmente expresadas que son blanco de miRNAs también diferencialmente expresados.

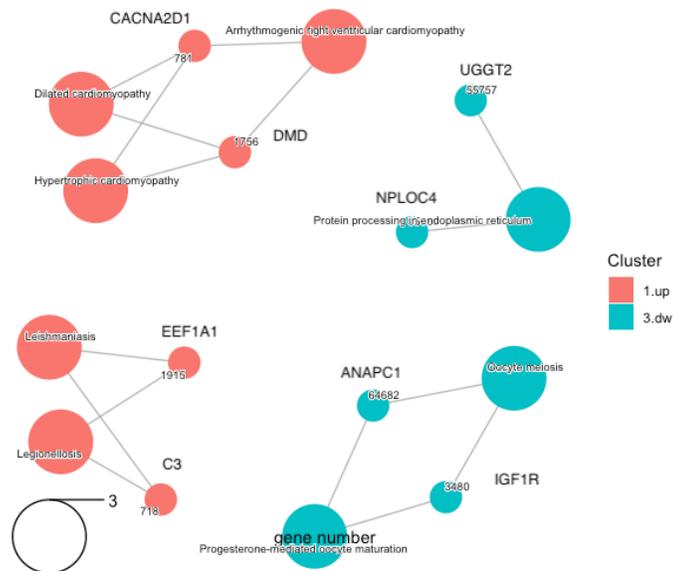


Figura Complementaria 9. Red de interacción de los términos sobre representados para las proteínas diferencialmente expresadas que son blanco de miRNAs también diferencialmente expresados en la biblioteca KEGG.