

Idónea comunicación de resultados

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Cuajimalpa

Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería

**“Evaluación transcripcional de genes candidatos en el proceso de regeneración de
extremidades de *Ambystoma mexicanum*”**

Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería

Presenta:

Bio. Mol. Jossephlyn Hernández Alcántara

Directores:



Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Cuajimalpa



Dra. Cynthia Gabriela Sámano Salazar
Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Cuajimalpa

Asesor:



Dr. Víctor Hugo Hernández González
Universidad de Guanajuato, Campus León



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado del 17 de octubre del 2022 al septiembre del 2024 en los laboratorios del DCN de la DCNI.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 25 del mes marzo del año 2025, la que suscribe Jossephlyn Hernández Alcántara alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autora intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada; "Evaluación transcripcional de genes candidatos en el proceso de regeneración de extremidades de *Ambystoma mexicanum*" realizada bajo la dirección del Dr. Ernesto Soto Reyes Solís y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del director del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: esotoreyes@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Jossephlyn Hernández Alcántara

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Jossephlyn Hernández Alcántara, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



Jossephlyn Hernández Alcántara

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Jossephlyn Hernández Alcántara alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Jossephlyn Hernández Alcántara.



Jossephlyn Hernández Alcántara

Índice

Agradecimientos	3
Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	
1.1. Los organismos con capacidad de regeneración tisular.....	6
1.2. Los modelos de investigación del proceso de regeneración tisular.....	6
1.3. <i>Ambystoma mexicanum</i> como modelo de estudio para el proceso de regeneración tisular.....	7
1.4. Las características anatómicas de <i>A. mexicanum</i>	8
1.5. El ciclo de vida de <i>A. mexicanum</i>	10
1.6. El proceso de regeneración de extremidades de <i>A. mexicanum</i>	11
1.7. Algunos de los genes asociados al proceso de regeneración tisular de <i>A. mexicanum</i>	13
1.8. En <i>A. mexicanum</i> la expresión génica fluctúa durante el desarrollo del blastema.....	15
1.9. La capacidad de regeneración tisular de <i>A. mexicanum</i> disminuye con el envejecimiento.....	16
1.10. Los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i> podrían ser clave en el proceso de regeneración de las extremidades de <i>A. mexicanum</i>	17
1.11. El gen <i>Gpx7</i> está relacionado con el metabolismo de H ₂ O ₂ y con el proceso de reparación tisular.....	18
1.12. El gen <i>Cthrc1</i> está relacionado con el proceso de reparación tisular.....	19
1.13. El gen <i>Fstl1</i> está relacionado con el proceso de desarrollo.....	20
1.14. El gen <i>Adamts17.1</i> codifica para metaloproteinasa de matriz extracelular.....	20
2. Planteamiento del problema	22
3. Preguntas de investigación	22

4. Hipótesis	22
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivos específicos.....	23
6. Materiales y métodos	
6.1. Organismos empleados.....	24
6.2. Protocolo de anestesia y de amputación.....	24
6.3. Extracción de ARN y diseño de oligonucleótidos sintéticos para PCR cuantitativa en tiempo real.....	25
6.4. Evaluación transcripcional de los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i>	27
6.5. Caracterización <i>in silico</i> del promotor de los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i>	27
6.5.1. Identificación de la región promotora de los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i>	27
6.5.2. Búsqueda de motivos de unión para factores de transcripción en el promotor de los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i>	28
6.6. Evaluación de la proteína ADAMTS17, mediante las técnicas de <i>Western Blot</i> e inmunohistoquímica.....	28
6.6.1. Selección del anticuerpo contra la proteína ADAMTS17 y análisis de su masa molecular.....	28
6.6.2. Cultivo celular.....	29
6.6.3. Extracción de proteínas empleadas para los ensayos de <i>Western blot</i> .	30
6.6.4. Inmunohistoquímica.....	31
7. Resultados	
7.1. Identificación del promotor tentativo de los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i>	33
7.2. Los factores de transcripción con motivos de unión en el promotor de los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i>	34
7.3. Evaluación de la expresión de los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i> en blastemas formados a los 10 y 20 dpa durante la regeneración del autopodio de <i>A. mexicanum</i> de 8 meses de edad.....	35

7.4. Evaluación de la expresión de los genes <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i> en el autopodio de <i>A. mexicanum</i> de 8 meses y 8 años de edad.....	36
7.5. Evaluación de la proteína ADAMTS17 en el autopodio de <i>A. mexicanum</i>	36
8. Discusión.....	39
8.1. Los cambios en la expresión de <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i> durante el proceso de regeneración del autopodio de <i>A. mexicanum</i> de 8 meses de edad.....	39
8.2. Las diferencias en la expresión de <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i> en el autopodio de <i>A. mexicanum</i> de 8 meses versus 8 años de edad.....	41
8.3. Los elementos de regulación transcripcional en el promotor tentativo de <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i>	41
9. Conclusiones.....	44
10. Limitaciones del estudio.....	45
11. Perspectivas.....	46
12. Anexos	
12.1. Método en extenso para la extracción de ARN de muestras de tejido de autopodio y de blastema.....	47
12.2. Método en extenso para los ensayos de <i>Western blot</i>	48
12.3. Localización de los oligonucleótidos sintéticos de <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> , <i>Cthrc1.1</i>	50
12.4. Localización del enriquecimiento de la modificación postraducciona H3K4me3 y de la isla CpG en el promotor de los genes <i>Gapdh</i> , <i>Adamts17.1</i> , <i>Fstl1</i> , <i>Gpx7</i> y <i>Cthrc1.1</i> de <i>A. mexicanum</i>	51
13. Bibliografía.....	52

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Cuajimalpa y al Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, por haber permitido el desarrollo de este proyecto en el Laboratorio de Biología Celular.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del Fondo CB-SEP-CONACyT 284748 y PRODEP (511/2023-3066-1599) otorgados al Dr. Ernesto Soto-Reyes, así como por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) mediante el Fondo Ciencia de Frontera (CF-2023-G-1558) otorgado a la Dra. Cynthia Sámano S. El Dr. Ernesto Soto-Reyes y la Dra. Cynthia Sámano S. recibieron apoyo del Departamento de Ciencias Naturales (DCN), de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) y de la UAM-Cuajimalpa, a través de los Proyectos Divisionales 47301025 y 47301026, respectivamente. También fueron respaldados por la Red de Biotecnología y Bioingeniería, apoyada por Rectoría General de la UAM. Jossephlyn Hernández Alcántara es estudiante de maestría en el “Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería (PCNI)” de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa (UAM-C), y recibió una beca de maestría de CONAHCyT (CVU 1252067).

Este proyecto fue aprobado por el comité de ética en investigación (CEI) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (CEI.2023.007).

Agradezco a mis directores principales, el Dr. Ernesto Soto Reyes Solís y la Dra. Cynthia Gabriela Sámano Salazar, por brindarme lo necesario para culminar mi proyecto. También agradezco al Dr. Víctor Hugo Hernández González, por su asesoría, así como al Dr. Carlo César Cortés González y el Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra que apoyaron en los ensayos realizados de inmunohistoquímica y Western Blot en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

Agradezco infinitamente a mi familia por su apoyo incondicional, a los lobos por acompañarme en las noches largas y a mis queridos compañeros, Sofí, Ger y Carlos, por los consejos y las risas interminables.

lml.

Resumen

Ambystoma mexicanum, presenta una alta capacidad para regenerar diversos órganos internos y extremidades durante todo su ciclo de vida (1). Sin embargo, a medida que *A. mexicanum* envejece el proceso de regeneración toma más tiempo (2) o no ocurre (3). El estudio de los organismos que pierden la capacidad de regeneración tisular, podría brindar información sobre los elementos clave para este proceso. En este sentido, se ha propuesto que los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* podrían ser fundamentales para el proceso de regeneración, ya que su expresión es mayor en organismos de 8 meses de edad que regeneran el autopodio amputado en comparación con organismos de 8 años que no presentan regeneración a los 10 días post-amputación (dpa) (3). Sin embargo, no se ha analizado el comportamiento transcripcional de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el periodo en el que ocurre la mayor cantidad de cambios transcripcionales, entre los 9 y 24 dpa (4,5). Por ello, en este trabajo evaluamos su expresión en el blastema a los 10 y 20 dpa en *A. mexicanum* de 8 meses, así como en el autopodio de organismos de 8 meses y 8 años de edad. Nuestros resultados, mostraron que la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* es significativamente menor en el autopodio de los organismos de 8 años en comparación con los organismos de 8 meses. Por el contrario, durante el proceso de regeneración en los organismos de 8 meses, la expresión de *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* tiende a disminuir en el blastema a los 10 dpa y 20 dpa, mientras que *Adamts17.1* presentó un comportamiento opuesto, con niveles altos a los 10 dpa y bajos a los 20 dpa. Mediante la caracterización *in silico* del promotor tentativo de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*, encontramos que su expresión podría ser regulada por factores de transcripción asociados a modificaciones postraduccionales de histonas y al proceso de desarrollo en vertebrados. En conjunto, estos hallazgos constituyen un punto de partida para la evaluación del papel de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el proceso de regeneración del autopodio de *A. mexicanum*.

Abstract

Ambystoma mexicanum exhibits a high capacity to regenerate various internal organs and limbs throughout its life cycle (1). However, as *A. mexicanum* ages, the regeneration process takes longer (2) or does not occur at all (3). Studying organisms that lose their ability to regenerate tissues could provide insights into the key elements of this process. In this regard, the genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, and *Cthrc1.1* have been proposed as fundamental to the regeneration process, as their expression is higher in 8-month-old organisms that regenerate the amputated autopodium compared to 8-year-old organisms that do not show regeneration at 10 days post-amputation (dpa) (3). However, the transcriptional behavior of *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, and *Cthrc1.1* during the period when most transcriptional changes occur, between 9 and 24 dpa (4,5), has not been analyzed. Therefore, in this study, we evaluated their expression in the blastema at 10 and 20 dpa in 8-month-old *A. mexicanum*, as well as in the autopodium of both 8-month-old and 8-year-old organisms. Our results showed that the expression of *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, and *Cthrc1.1* is significantly lower in the autopodium of 8-year-old organisms compared to 8-month-old ones. Conversely, during the regeneration process in 8-month-old organisms, the expression of *Fstl1*, *Gpx7*, and *Cthrc1.1* tends to decrease in the blastema at 10 and 20 dpa, whereas *Adamts17.1* exhibited an opposite pattern, with high levels at 10 dpa and low levels at 20 dpa. Through *in silico* characterization of the putative promoters of *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, and *Cthrc1.1*, we found that their expression could be regulated transcription factors associated with post-translational modifications and vertebrate development. Taken together, these findings provide a starting point for evaluating the role of *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, and *Cthrc1.1* in the autopodium regeneration process of *A. mexicanum*.

1. Introducción

1.1. Los organismos con capacidad de regeneración tisular

La regeneración se define como la capacidad de reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados en etapas post-embrionarias (6). En la naturaleza, diversos organismos presentan distintas capacidades regenerativas, que van desde la restauración de tejidos hasta la regeneración de estructuras complejas o incluso organismos completos (1,7). Por ejemplo, algunas especies de planarias (*Schmidtea mediterranea* o *Dugesia japonica*) y de hidras (*Hydra vulgaris*) pueden regenerar un organismo entero a partir de un fragmento de tejido (7). En el caso de los vertebrados, las salamandras poseen una notable capacidad regenerativa, que les permite restaurar extremidades completas y otras partes del cuerpo tras una lesión o amputación (1,8). En contraste con estos organismos, los mamíferos presentan capacidades de regeneración tisular limitadas a ciertos órganos. En el caso particular de los humanos, la capacidad de regeneración tisular se limita a ciertos tejidos y estructuras. Por ejemplo, después de la resección de un fragmento del hígado, la parte perdida puede ser regenerada, sin embargo, en algunos casos esto no sucede y en el 43.7% de los casos los pacientes desarrollan fallo hepático (9). Por otro lado, la regeneración de extremidades se limita a la regeneración de pequeñas estructuras, tales como las puntas de los dedos. No obstante, si el daño involucra estructuras localizadas debajo de la primera falange, la regeneración no ocurre (10).

Las limitaciones en la capacidad de regeneración tisular humana, han generado interés por investigar los mecanismos que permiten que ciertos organismos tengan altas capacidades de regeneración tisular, lo cual podría permitir generar terapias que permitan el incrementar o mejorar la capacidad de regeneración tisular innata de los mamíferos (11).

1.2. Los modelos de investigación del proceso de regeneración tisular

Los modelos de investigación de los mecanismos de regeneración tisular incluyen a organismos invertebrados y vertebrados. Los invertebrados como las hidras y las planarias, son los organismos modelo con la máxima capacidad de regeneración tisular, ya que regeneran organismos completos a partir de fragmentos de tejido (12,13). Si bien, el estudio del proceso de regeneración tisular de estas especies ha contribuido a la identificación de elementos asociados a dicho proceso, no representan el modelo de estudio más adecuado debido a las diferencias anatómicas y fisiológicas con los vertebrados, además de las limitaciones experimentales en el desarrollo de estudios moleculares (12,13)

Los vertebrados como peces, ranas y salamandras, regeneran una gran variedad de órganos internos y extremidades dañadas o perdidas. Estos organismos se diferencian uno del otro según las estructuras y el grado de daño tisular que regeneran. El pez cebra (*Danio rerio*), es el pez más utilizado como modelo de estudio, ya que tiene la capacidad de regenerar una gran cantidad de órganos internos como corazón, hígado, cerebro y aletas (14). En contraste, los anfibios del orden anura tienen capacidades de regeneración limitadas; por ejemplo, las ranas de las especies *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*, regeneran extremidades, cola, columna vertebral y retina durante la etapa larval, sin embargo, una vez

que el organismo alcanza la madurez con la metamorfosis, pierde la capacidad de regeneración de varios tejidos, con excepción de la regeneración de la retina (15).

Las salamandras se han convertido en uno de los modelos de investigación más usados en regeneración tisular, debido a que son los únicos vertebrados capaces de regenerar extremidades completas como organismos adultos (16). Las especies más usadas como modelo de estudio son: *Notophthalmus viridescens*, *Cynops phyrrogaster*, *Pleurodeles waltl* y *Ambystoma mexicanum*. Particularmente *A. mexicanum*, es la salamandra más utilizada como modelo de estudio por varias razones: 1) regenera un gran variedad de organismos internos como cerebro, corazón e hígado; 2) regenera estructuras complejas, como el apéndice caudal incluyendo a la columna vertebral y cualquier estructura de las extremidades o extremidades completas (17); 3) su ciclo de vida es completamente acuático en comparación con el ciclo de vida híbrido de otras especies de salamandras, lo que facilita su mantenimiento en condiciones de laboratorio (1); 4) el estudio del proceso de regeneración tisular de *A. mexicanum* se puede realizar mediante abordajes ómicos, ya que su genoma (18) y transcriptoma (19) han sido ensamblados y anotados, lo cual no es posible para otras especies de salamandras, pues su genoma y transcriptoma aún se desconocen (1,20).

1.3. *Ambystoma mexicanum* como modelo de estudio para el proceso de regeneración tisular

La familia *Ambystomatidae* incluye al género *Ambystoma* y abarca un total de 33 especies que se distribuyen desde el norte de América hasta el sur de México. De estas especies, diecisiete se encuentran en México, incluyendo a *A. mexicanum* (21). *Ambystoma mexicanum* es un anfibio del orden caudata endémico de la zona lacustre de la Ciudad de México (CDMX), incluyendo a los humedales de Xochimilco (22,23).

A pesar de ser un organismo endémico de México, su historia como modelo de estudio comenzó en Francia, donde se estableció la primera colonia de *A. mexicanum* en Europa (24). En el año 1864 se trasladaron 34 organismos desde México a Francia, de estos organismos seis fueron estudiados por el herpetólogo Auguste Duméril, quien se percató de la gran capacidad de regeneración tisular de *A. mexicanum*, pues después de amputar las branquias estas volvían a crecer (24). También determinó las condiciones necesarias para mantener vivos y reproducir a estos organismos fuera de su hábitat natural, lo cual permitió que esta especie se volviera común en acuarios y zoológicos en Europa. Hasta el año 1914, la mayoría de los ejemplares de *A. mexicanum* en este continente descendían de los organismos fundadores con los linajes ancestrales estudiados por Auguste Duméril (24), hasta que tiempo después a la colonia se introdujo a *Ambystoma tigrinum* de fenotipo albino, para crear organismos híbridos entre *A. mexicanum* y *Ambystoma tigrinum* (25,26).

Actualmente, la colonia más grande de *A. mexicanum* se localiza en el *Ambystoma Genetic Stock Center* (AGSC, por sus siglas en inglés) de la Universidad de Kentucky. En el AGSC se mantienen organismos de *A. mexicanum* silvestres provenientes de los organismos fundadores, así como de cruces entre *A. mexicanum* y de *A. tigrinum*, que se distribuyen con fines educativos y de investigación (27). Diversos grupos de investigación utilizan como modelo experimental a los organismos provenientes del AGSC. Sin embargo, se ha propuesto que los ejemplares silvestres del AGSC presentan ADN de *A. tigrinum* (Woodcock et al., 2017). Esta conclusión se basa en el trabajo de Woodcock y

colaboradores, quienes compararon el genoma de *A. mexicanum* silvestre, derivado de los organismos fundadores, con el de híbridos de *A. mexicanum* y *A. tigrinum*. Sus resultados indican que incluso el genoma de *A. mexicanum* silvestre conserva aproximadamente un 5.8% de ADN de *A. tigrinum*. No obstante, en este estudio, los autores no describen en detalle la composición restante del genoma de *A. mexicanum* silvestre (25). Estos hallazgos sugieren que los linajes ancestrales de *A. mexicanum* se han diluido en los organismos mantenidos en institutos como el AGSC debido a la hibridación con *A. tigrinum* (25,28).

En México, la población de *A. mexicanum* en estado silvestre en los humedales de Xochimilco ha disminuido debido a la introducción de especies invasoras y al aumento de la contaminación del agua. Esta situación ha llevado a que *A. mexicanum* se clasifique como una especie en peligro de extinción según la NOM-059-Semarnat-2010. Para hacer frente a esta problemática, en México se han establecido Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) con el propósito de preservar la especie de *A. mexicanum*; una de estas UMA es el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC), que se ubica en Xochimilco (29). El CIBAC mantiene a los organismos de *A. mexicanum* en cautiverio con el fin de conservar y reproducir la especie en condiciones similares a las de su hábitat natural, para su uso tanto con fines educativos como de investigación. En conjunto, los ejemplares silvestres de *A. mexicanum* silvestres endémicos de Xochimilco, como aquellos mantenidos por el CIBAC, representan un modelo para el estudio de la regeneración tisular en esta especie. Su uso permitiría investigar este proceso en condiciones más cercanas a las ancestrales de *A. mexicanum*.

1.4. Las características anatómicas de *A. mexicanum*

El esqueleto de *A. mexicanum* no está completamente osificado, por el contrario, es de naturaleza cartilaginosa y da lugar a una cabeza, un apéndice caudal y cuatro extremidades (Figura 1). Uno de los elementos anatómicos que caracterizan a *A. mexicanum* es su cabeza grande, que en cada lado presenta tres branquias externas. Las extremidades anteriores son más pequeñas que las extremidades posteriores, debido a que las primeras presentan cuatro dedos, mientras que las segundas presentan cinco dedos. Por otro lado, presenta órganos internos como: corazón, cerebro, estómago, intestino, vejiga, hígado, riñones, bazo, páncreas, las hembras presentan ovarios y los machos presentan testículos (21,22).

Las extremidades anteriores y posteriores de *A. mexicanum* están compuestas por tres estructuras distintas: el estilopodio, que corresponde al brazo superior; el zeugopodio, que corresponde al brazo intermedio; y el autopodio, que es la parte final de la extremidad (Figura 1) (30). En las extremidades anteriores, el estilopodio está formado por el húmero, el zeugopodio está compuesto por el radio y la ulna, y el autopodio incluye a los metacarpos, carpo radial, carpo ulnar y carpo intermedio. Por otro lado, en las extremidades posteriores, el estilopodio está constituido por el tarso y el fémur, el zeugopodio está formado por la fibula y la tibia, y el autopodio incluye los metatarsos, falange proximal, falange media y falange distal (30).

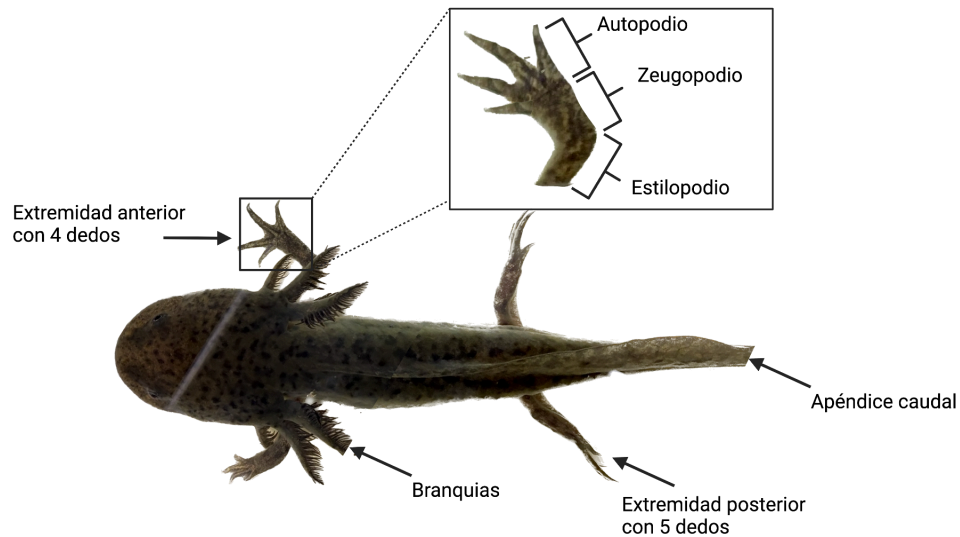


Figura 1. Fotografía de un ejemplar de fenotipo silvestre de *A. mexicanum* adulto y sus elementos anatómicos. Uno de los elementos anatómicos que caracteriza a *A. mexicanum* son las branquias externas en cada lado de la cabeza. Presentan un apéndice caudal y cuatro extremidades: dos anteriores y dos posteriores, ambas conformadas por el autopodio, zeugopodio y estilopodio. La fotografía presentada proviene de organismos que se encuentran en el CIBAC, UAM-Xochimilco.

Ambystoma mexicanum es una salamandra acuática, sin embargo, cuenta con tres mecanismos de respiración: intercambian el oxígeno en el agua con sus branquias externas, mediante su piel altamente vascularizada o mediante respiración pulmonar (22). Los diferentes mecanismos de respiración de *A. mexicanum* permiten que se mantenga por largos períodos de tiempo fuera del agua sin morir, lo cual facilita su manipulación durante procesos quirúrgicos (22).

La piel de *A. mexicanum* se encuentra cubierta por una capa de moco secretada por las células mucosas de Leydig. Su pigmentación es variable y se debe a cromatóforos producidos por células derivadas de la cresta neural: los melanóforos generan eumelanina, proporcionando la pigmentación negra; los xantófitos producen pteridinas, que brindan tonalidades desde el amarillo hasta el naranja; los iridóforos generan pigmentos que reflejan la luz, otorgando a la piel de los anfibios un aspecto brillante (21,31). *Ambystoma mexicanum* presenta fenotipos distintos respecto a la pigmentación de su piel; los organismos de pigmentación verde con manchas negras (Figura 1), son el fenotipo silvestre y su pigmentación está dada mayoritariamente por los melanóforos negros característicos de las etapas adultas, mientras que los xantófitos amarillos son más comunes en etapas tempranas del desarrollo (31). Por otro lado, el fenotipo albino se creó a partir de la cruce interespecífica de *A. mexicanum* silvestre con *A. tigrinum* de fenotipo albino. Estos organismos, tienen ojos blancos y su piel tiene una pigmentación amarilla, por lo cual también se conocen como organismos dorados (25,31). El fenotipo leucístico probablemente es el fenotipo más popular y estos organismos presentan una pigmentación rosa debido a la mutación del gen de la endotelina 3 (25).

1.5. El ciclo de vida de *A. mexicanum*

En cautiverio *A. mexicanum* puede ser reproducido cada 3 a 6 meses, manteniendo la temperatura del agua a 12°C. Una hembra puede poner desde 660 a 1000 huevos cada vez, sin embargo, una vez que las hembras superan los 5 años de edad la viabilidad de los huevos disminuye, por lo que estos organismos ya no se consideran viables para su reproducción (23).

En los anfibios la fecundación de los óvulos puede ser interna o externa, la diferencia radica en si la fertilización de los óvulos por los espermatozoides se da en el interior o en el exterior de la hembra, respectivamente (21). Específicamente en *A. mexicanum* la fecundación es interna, esto implica que los machos secretan a los espermatozoides al medio acuoso y las hembras los absorben mediante la cloaca (21,23). En la cloaca, se almacenan los óvulos maduros que serán fecundados, los cuales se depositan sobre hojas o ramas en el agua y después de 12 a 15 días, las larvas eclosionan (23). Las larvas de *A. mexicanum* presentan un apéndice caudal y las branquias externas en cada lado de la cabeza, después de eclosionar crecen hasta desarrollar las extremidades anteriores seguidas de las extremidades posteriores (23) (Figura 2). Después de un año de vida, se consideran organismos adultos y sexualmente maduros (22,23).

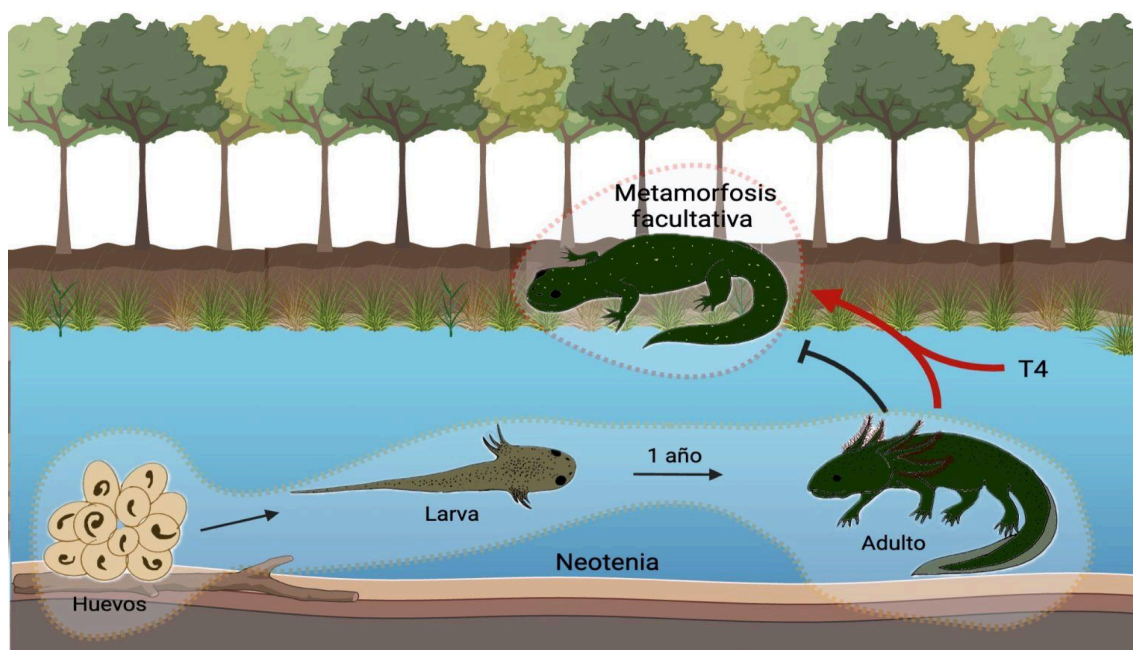


Figura 2. Representación gráfica del ciclo de vida de *A. mexicanum*. El ciclo de vida de *A. mexicanum* comienza cuando los huevos eclosionan, posteriormente la larva crece hasta desarrollar las extremidades anteriores y después de un año alcanza la etapa adulta. Sin embargo, de forma exógena *A. mexicanum* puede ser transformado a una salamandra terrestre mediante la inducción de la metamorfosis facultativa por la exposición a la hormona tiroxina (T4) (32). Elaborada con Biorender.com.

El proceso de maduración de los anfibios con apéndice caudal, implica la transición de la forma larval a organismos adultos sexualmente maduros, ocurre mediante dos procesos: metamorfosis o neotenia. En la metamorfosis, las larvas permanecen en ambientes acuáticos hasta alcanzar la madurez sexual, lo cual implica cambios físicos y fisiológicos drásticos que incluyen la pérdida de las características larvales, como el apéndice caudal y

las branquias, lo que les permite vivir en ambientes terrestres o semiacuáticos (21). El proceso contrario a la metamorfosis es la neotenia, pues la maduración de los organismos no implica la pérdida de las características juveniles, sino que se mantienen durante todo el ciclo de vida aún como organismos sexualmente maduros. *Ambystoma mexicanum* es un anfibio neoténico debido a que mantiene características juveniles durante la fase adulta, lo cual le permite vivir en ambientes acuáticos y terrestres. Sin embargo, es posible inducir experimentalmente la metamorfosis en *A. mexicanum* mediante la exposición a hormonas. A este proceso se le conoce como metamorfosis facultativa (22).

En general, durante el desarrollo de los anfibios las hormonas producidas por la tiroides participan en el proceso de metamorfosis, pues durante esta etapa los niveles de las hormonas tiroideas incrementan hasta que el organismo alcanza la metamorfosis (33). Por el contrario, durante el desarrollo de *A. mexicanum* los niveles de las hormonas producidas por la tiroides no incrementan. Debido a esto se ha propuesto que la deficiencia de dichas hormonas está asociada a la neotenia de *A. mexicanum* (34). Esta propuesta ha sido reforzada por trabajos en los que al disminuir los niveles de agua en los que se mantiene el organismo y al administrar la hormona tiroxina (también conocida como hormona T4), *A. mexicanum* alcanza la metamorfosis (32,35). La diferencia entre *A. mexicanum* neoténicos y metamórficos radica en cambios físicos y fisiológicos: los cambios físicos de los organismos de *A. mexicanum* metamórficos incluyen: la pérdida de las branquias exteriores y de la aleta dorsal, el tamaño de las extremidades anteriores y posteriores incrementa, al igual que el tamaño de los ojos. A nivel fisiológico, uno de los cambios más relevantes para el proceso de regeneración tisular es que la inducción experimental de la metamorfosis de *A. mexicanum* compromete la capacidad de regeneración tisular, pues el tiempo necesario para regenerar la extremidad amputada incrementa y provoca defectos anatómicos en comparación con organismos neoténicos, debido a esto se ha propuesto que la neotenia está estrechamente relacionada con la capacidad de regeneración de *A. mexicanum* (32,36).

1.6. El proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*

El proceso de regeneración de una extremidad se activa cuando hay pérdida parcial o completa de alguna de las estructuras que conforman a las extremidades anteriores y posteriores, tales como estilopodio, zeugopodio y/o autopodio. Se ha descrito que el proceso de regeneración tisular involucra cuatro etapas: 1) formación del epitelio de herida (*Wound epithelium*, WE, por sus siglas en inglés); 2) formación de la capa epitelial apical (*Apical epithelial cap*, AEC, por sus siglas en inglés); 3) formación y crecimiento del blastema, donde ocurren procesos de dediferenciación y rediferenciación celular; 4) crecimiento de la estructura regenerada (37,38) (Figura 3).

Una característica importante del proceso de regeneración de extremidades es que el blastema hasta formar únicamente la parte perdida de la extremidad (41). Este proceso recibe el nombre de regeneración distal y hace referencia a que solamente se regeneran las estructuras distales al sitio de la amputación, por ejemplo: si se amputa el autopodio no se regenera el zeugopodio y el autopodio. Después de su formación, el blastema crece hasta que se forman los dedos, aproximadamente a los 30 dpa (42). En esta etapa ya no se considera blastema, sino una extremidad completamente regenerada (42). El tiempo necesario para regenerar completamente la estructura pérdida es variable y depende de cada organismo, por ejemplo: animales grandes de 25 cm de longitud regeneran la extremidad en 53 dpa, mientras que animales de 15 cm regeneran la extremidad en 49 dpa y animales pequeños de 8 cm a los 31 dpa presentan la extremidad regenerada (8). Posteriormente, la extremidad regenerada pasa por una etapa de crecimiento hasta alcanzar el tamaño adecuado de una extremidad proporcional al tamaño del ejemplar y a su contraparte, la extremidad no amputada. Esta etapa de crecimiento puede tomar hasta 140 días en ejemplares de 10 cm de longitud (42).

1.7. Algunos de los genes asociados al proceso de regeneración tisular de *A. mexicanum*

Los estudios sobre la regeneración de extremidades de *A. mexicanum* se han enfocado en la evaluación del transcriptoma del blastema, lo cual ha sido posible gracias a que en el año 2018 el genoma de *A. mexicanum* leucístico fue secuenciado (18). Después del genoma del pez pulmonado *Lepidosiren paradoxa*, el genoma de *A. mexicanum* es uno de los genomas secuenciados más extensos (43), con un tamaño de 32 Gb, distribuido en 14 pares de cromosomas y con aproximadamente 23,251 genes que codifican para proteínas (18,44). El gran tamaño del genoma de *A. mexicanum* se atribuye a que el 65.6% son elementos repetidos y a que las regiones intrónicas son 13 y 25 veces más extensas que las de humanos y ranas, respectivamente (18). Debido al gran tamaño del genoma de esta especie, la evaluación transcriptómica del proceso de regeneración tisular ha sido un reto científico hasta ahora.

Cabe destacar que el genoma reportado de *A. mexicanum* corresponde al fenotipo leucístico y no al silvestre (18,44), lo cual es consistente con el hecho de que la mayoría de los estudios sobre regeneración tisular utilizan organismos leucísticos como modelo de investigación. Por lo que, los organismos de *A. mexicanum* silvestres nativos de Xochimilco, representan un modelo de estudio para evaluar con mayor precisión los mecanismos celulares y moleculares de regeneración tisular de *A. mexicanum*. Sin embargo, los estudios previos sobre la evaluación transcriptómica del blastema mediante RNA-Seq y microarreglos han mostrado resultados consistentes que han permitido identificar genes asociados al proceso de regeneración de extremidades (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos de los genes y su función propuesta para el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*

Gen	Función asociada al proceso de regeneración de extremidades	Referencia
<i>Meis</i>	Regeneración de estilopodio.	(45)
<i>Hoxa13</i>	Regeneración del autopodio.	(46)
<i>Shh</i>	Proliferación celular y mantenimiento del crecimiento del blastema.	(47)
<i>Fgf-8</i>	Proliferación celular y mantenimiento del crecimiento del blastema.	(47)
<i>Bmp2</i>	Proliferación celular y osteogénesis.	(48,49)
<i>Mmp</i>	Respuesta inmune y morfogénesis.	(50,51)

Una de las características intrigantes del proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum* es que solo se regeneran las estructuras distales al sitio de la amputación. Esto se debe a que las células en el blastema adquieren una identidad posicional, lo cual se refiere a que la expresión de genes específicos en el blastema determina la posición distal (autopodio) o proximal (estilopodio) que tendrán en la extremidad regenerada (52). Ejemplo de estos genes son *Hoxa13* y *Meis*. Durante la regeneración del estilopodio, el gen *Meis* se sobreexpresa, mientras que el gen *Hoxa13* se subexpresa en los primeros días después de la amputación, cuando el blastema corresponde a las estructuras proximales del estilopodio (45). A medida que se convierte en un blastema distal que dará origen a las estructuras distales del autopodio, el gen *Meis* se subexpresa mientras que el gen *Hoxa13* se sobreexpresa (46). A partir de estos reportes, se ha propuesto que el gen *Meis* es específico del proceso de regeneración del estilopodio, mientras que el gen *Hoxa13* es característico del proceso de regeneración del autopodio, lo cual contribuye al establecimiento de la identidad posicional de las células en el blastema (45,46).

Otros genes sugeridos, que intervienen tanto en la vía de señalización de Wnt y Fgf como en el establecimiento de la posición de las células en el blastema (47), también participan en la proliferación celular (53). Ejemplo de estos genes son, *Fgf-8* y *Shh*, los cuales se sobreexpresan en el blastema en comparación con la extremidad (5,49), favoreciendo la proliferación celular que permite el crecimiento del blastema (47). Otro de los genes ampliamente estudiados en el proceso de regeneración tisular de *A. mexicanum* es el gen *Bmp2*. Este gen se sobreexpresa en el blastema, lo cual favorece la proliferación celular y el proceso de osteogénesis, ya que la inhibición de la proteína codificada por *Bmp2* impide la formación de las estructuras óseas de la extremidad (48,49).

El proceso de regeneración de extremidades también se caracteriza por presentar cambios

en la expresión de genes asociados a la matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM, por sus siglas en inglés). En el blastema se sobreexpresan los genes relacionados con la degradación de ECM, como *Mmp8*, *Mmp13* y *Mmp9* que codifican para las metaloproteinasas de ECM (5). Aunque no se ha definido por completo el papel de estos genes en el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*, se han relacionado con la migración celular (38) y la respuesta inmune por los macrófagos en el blastema (50), mientras que la inhibición de estas proteínas impide la regeneración de la estructura perdida o resulta en la regeneración de una estructura con malformaciones (51). Esto sugiere que los elementos de ECM son relevantes para el proceso de regeneración tisular, sin embargo, su papel aún no se conoce a profundidad.

Aunque se han identificado genes clave para el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*, su expresión cambia significativamente durante el desarrollo del blastema (4,5). Este comportamiento dinámico de la expresión génica, apunta a que existen periodos temporales en donde la evaluación transcripcional del blastema podría permitir identificar genes relevantes para el proceso de regeneración de extremidades.

1.8. En *A. mexicanum* la expresión génica fluctúa durante el desarrollo del blastema

Diversos estudios han evaluado el proceso de regeneración de extremidades en *A. mexicanum* a lo largo del tiempo. Un ejemplo es el trabajo realizado por Voss y colaboradores, quienes mediante microarreglos llevaron a cabo la evaluación transcripcional de blastemas formados desde los 3 dpa hasta los 28 dpa de la extremidad en organismos de 6 a 10 meses de edad (4). Al comparar los distintos blastemas con la extremidad, los autores identificaron que la mayor cantidad de cambios transcripcionales ocurre entre los 9 y los 24 dpa.

A partir de estos hallazgos, se ha propuesto que los cambios transcripcionales relacionados con la regeneración de extremidades ocurren dentro de ventanas de tiempo limitadas (4). Esta propuesta está respaldada por los hallazgos realizados por Gerber y colaboradores, quienes mediante secuenciación de alto rendimiento de ARN de célula única, identificaron que la mayor cantidad de cambios transcripcionales en el blastema ocurren de los 11 dpa hasta los 18 dpa en larvas de 4 semanas de edad (Figura 4) (5). Estos hallazgos sugieren que en el blastema, entre los 9 dpa hasta los 24 dpa, es donde se presentan la mayor cantidad de cambios transcripcionales durante la regeneración de extremidades en *A. mexicanum*.

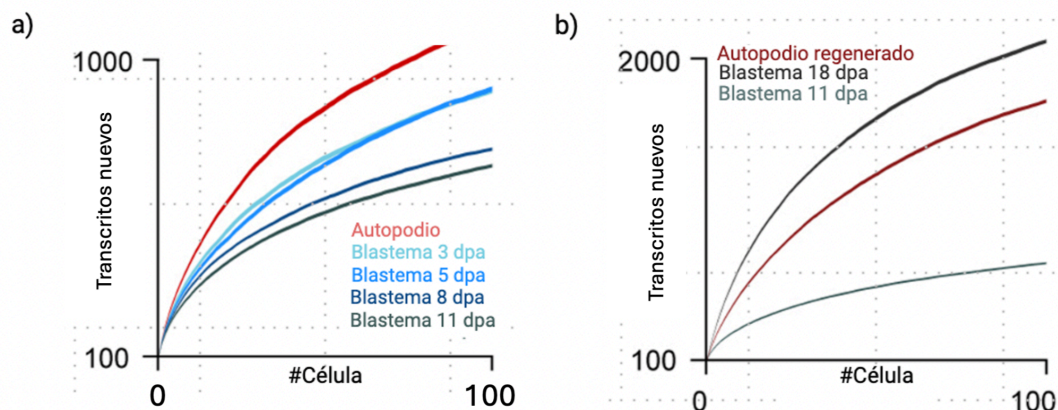


Figura 4. Gráficas que muestran los cambios transcripcionales del blastema a lo largo del tiempo durante el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*. a) La gráfica muestra el número de transcritos nuevos en células únicas del blastema formado de los 3 a los 11 dpa en comparación con la extremidad amputada. b) En esta gráfica se muestran los transcritos nuevos en células únicas del blastema de 11 y 18 dpa, así como en la extremidad regenerada en comparación con la extremidad amputada de *A. mexicanum*. Gráficas obtenidas y modificadas del trabajo de Gerber y colaboradores (5).

Una observación relevante relacionada con el periodo temporal comprendido entre los 9 hasta los 24 dpa es que los genes involucrados en la regeneración de extremidades de *A. mexicanum*, como *Hoxd10*, *Hoxa13* y *Meis*, cambian significativamente su expresión en este periodo (4,5,54). Por otro lado, la expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción Runx, Fos, Jun y Hox se mantiene constante del día 5 al 9 dpa, pero a los 13 dpa su expresión cambia de manera opuesta (4,17).

Estos reportes sugieren que en el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*, la mayor cantidad de cambios transcripcionales en el blastema ocurre entre los 9 a los 24 dpa. Por lo que la evaluación transcripcional del blastema en este periodo de tiempo podría permitir identificar si la expresión de otros genes, también cambia significativamente durante la regeneración de extremidades de *A. mexicanum* (4).

1.9. La capacidad de regeneración tisular de *A. mexicanum* disminuye con el envejecimiento

El estudio del proceso de regeneración tisular en mamíferos ha evidenciado que a medida que los organismos envejecen, la capacidad de regeneración tisular disminuye o incluso desaparece (55). La excepción a esta tendencia son los invertebrados como la hidra o la planaria, ya que regeneran organismos completos durante todo su ciclo de vida (55). Por el contrario, los vertebrados cumplen con la tendencia de reducción de la capacidad de regeneración tisular a medida que los organismos envejecen (56).

Un ejemplo de la reducción de la capacidad de regeneración tisular relacionada con el envejecimiento de los organismos es la regeneración de los ventrículos del corazón del pez cebra. En organismos de 7 años de edad, este proceso resulta en la formación de tejido cicatrizante que afecta el funcionamiento del corazón, mientras que esto no ocurre en organismos de 4 meses (57). Otro ejemplo son las ranas *X. laevis* y *X. tropicalis*, las cuales

son capaces de regenerar extremidades completas durante las etapas larvales; sin embargo, después de la metamorfosis, sólo se regenera una estructura cartilaginosa (43). Por otro lado, a pesar de que las salamandras son los organismos con la mayor capacidad de regeneración tisular como adultos, esta capacidad también disminuye a medida que los organismos envejecen, pues la estructura dañada o perdida no es regenerada (39, 44).

Algunas salamandras, como *Pleurodeles waltl* (58) y *Notophthalmus viridescens* (56), no presentan la reducción de la capacidad de regeneración tisular como organismos adultos, sin embargo, el tiempo del proceso incrementa en comparación con las etapas larvales. De forma interesante, en *A. mexicanum* la capacidad de regeneración tisular disminuye con el envejecimiento (8,59,60). Por ejemplo, Bryant y colaboradores demostraron que la amputación repetida del estilopodio desde los dos meses hasta un año de edad resultaba en la ausencia del blastema, impidiendo la regeneración de la extremidad (8). A partir de estos reportes, se ha propuesto que el estudio de los organismos que pierden la capacidad de regeneración tisular podría brindar información esencial sobre los elementos implicados en este proceso (5).

1.10 Los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* podrían ser clave en el proceso de regeneración de las extremidades de *A. mexicanum*

Recientemente, nuestro grupo de trabajo estudió el proceso de regeneración del autopodio de *A. mexicanum* de distintas edades, con el objetivo de identificar genes relevantes para este proceso. Para ello se evaluó el transcriptoma del blastema formado a los 10 dpa del autopodio de organismos de 8 meses de edad, así como el del autopodio de organismos de 8 años que no formaron blastema y que no regeneraron el autopodio en comparación con los organismos de 8 meses (3).

En los organismos de 8 meses de edad, los resultados mostraron que 2,673 genes cambiaron su expresión (*differentially expressed genes*, DEGs, por sus siglas en inglés) en el blastema a los 10 dpa en comparación con el autopodio. Al comparar los DEGs del blastema de 10 dpa con los DEGs de blastemas proximales (formados a partir de la amputación del estilopodio) y distales (formados a partir de la amputación del autopodio) reportados por otros estudios (61), se encontraron 1,251 DEGs en todas las condiciones (Figura 5a) (3).

Mediante la comparación de los DEG en el blastema de 10 dpa de los organismos de 8 meses con los DEG del autopodio de los organismos de 8 años, Del Moral-Morales y colaboradores, identificaron 26 DEGs presentes en todas las condiciones evaluadas (Figura 5b, recuadro negro) (3). Entre los 26 DEGs, destacan los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, *Cthrc1.1*, *NMT.19* y *NMT.20*, ya que su expresión en el blastema de 10 dpa de los organismos de 8 meses es opuesta a su expresión en el autopodio de los organismos de 8 años que no regeneraron el autopodio amputado (3). Sin embargo, los autores descartan a *NMT.19* y *NMT.20*, ya que la secuencia de residuos de aminoácidos codificada por estos genes tiene un bajo porcentaje de identidad con otros vertebrados. Además, la predicción de su estructura tridimensional mostró que el sitio catalítico de ambas proteínas está incompleto en *A. mexicanum*. Por el contrario, la secuencia de residuos de aminoácidos y la estructura tridimensional codificada por *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Cthrc1.1* y *Gpx7* presentan un alto porcentaje de identidad con otros vertebrados, incluidos mamíferos (3).

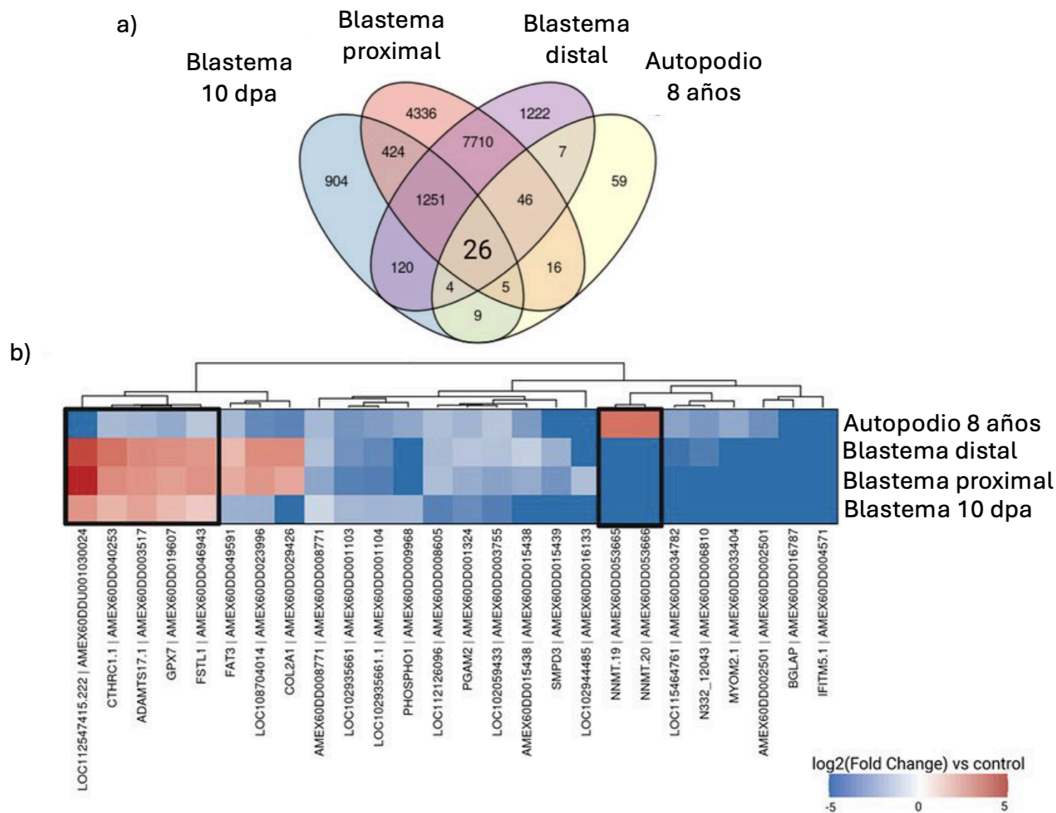


Figura 5. Gráficas que muestran las diferencias transcripcionales entre *A. mexicanum* de 8 meses y organismos de 8 años de edad. a) Diagrama de Venn que indica el número de genes con expresión diferencial entre el blastema de 10 dpa, el autopodio de los organismos de 8 años, así como entre el blastema distal y blastema proximal de 23 dpa (61). b) Mapa de calor que muestra la expresión de 26 genes diferencialmente expresados en el blastema distal, blastema proximal, blastema de 10 dpa y en el autopodio de los organismos de 8 años comparación con el autopodio de los organismos de 8 meses. Estas figuras fueron obtenidas y modificadas del trabajo realizado por Del Moral-Morales y colaboradores (3).

Dado que la capacidad de regeneración tisular de *A. mexicanum* disminuye con la edad (2,8), y que el enfoque adoptado por Del Moral-Morales y colaboradores considera esta diferencia, sus hallazgos sugieren que los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* podrían desempeñar un papel clave en la regeneración de extremidades en esta especie (3). Además, la conservación de las proteínas codificadas por estos genes indica su posible relevancia en diversas especies, lo cual es consistente con reportes en los que *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* han sido asociados a procesos celulares relacionados con la regeneración tisular (62–65).

1.11. El gen *Gpx7* está relacionado con el metabolismo de H_2O_2 y con el proceso de reparación tisular

En humanos el gen *GPX7* codifica para la proteína GPX7, la cual pertenece a la familia de las glutatión peroxidases (*glutathion peroxidases*, GPX por sus siglas en inglés) que forman parte del sistema antioxidante celular. En general, las GPX son enzimas que se encargan de regular los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroperóxidos

orgánicos mediante su reducción a alcoholes o a agua usando como agente reductor al glutatión (66). Específicamente, la proteína GPX7 se localiza en el lumen del retículo endoplasmático donde se encarga de reducir el H_2O_2 a agua (67). Considerando que la proteína GPX7 se encarga de disminuir los niveles de H_2O_2 y que esta especie reactiva de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS, por sus siglas en inglés) es clave en el proceso de regeneración de *A. mexicanum*, el papel del gen *Gpx7* en este proceso podría estar relacionado con los niveles de H_2O_2 . Esta propuesta deriva a partir de los reportes sobre la regeneración del apéndice caudal (68) y del autopodio (30) de *A. mexicanum*, en los cuales la amputación de estas estructuras genera el incremento de los niveles de H_2O_2 . Particularmente durante el proceso de regeneración del autopodio, los niveles de H_2O_2 son mayores en el blastema hasta los 21 dpa, mientras que la inhibición de la producción de H_2O_2 resulta en el retraso de la formación del blastema, en la regeneración de un autopodio con metacarpos faltantes y de menor longitud (30).

En relación con la posible conexión del gen *Gpx7* con el proceso de regeneración tisular mediante el metabolismo de ROS, también se han realizado hallazgos relacionados con el proceso de reparación tisular de mamíferos. En modelos murinos el gen *Gpx7* está relacionado con el proceso de reparación tisular, pues la expresión de este gen es mayor en la piel de los modelos murinos y de humanos en las etapas fetales, mientras que su expresión es menor en las etapas adultas. Sin embargo, la expresión de *Gpx7* aumenta en los queratinocitos de los modelos murinos adultos cuando se realiza una lesión cutánea, lo cual favorece el cierre de la lesión al promover la migración de los queratinocitos (65). Estos hallazgos indican que *Gpx7* podría estar relacionado con el proceso de reparación tisular en mamíferos, lo que plantea interrogantes sobre su papel en el proceso de regeneración tisular de otros organismos, como *A. mexicanum*.

1.12. El gen *Cthrc1* está relacionado con el proceso de reparación tisular

En humanos, el gen *CTHRC1* codifica para una proteína colágena con repetidos de triple hélice (*Collagen Triple Helix Repeat Containing*, *CTHRC* por sus siglas en inglés). Este gen, al igual que *Gpx7*, está relacionado con el proceso de reparación tisular de modelos murinos (64,69). En la piel de organismos adultos, los niveles del transcrito del gen *Cthrc1* incrementan después de realizar lesiones cutáneas y el abatimiento de su expresión retrasa el cierre de la lesión, mientras que su sobreexpresión tiene el efecto contrario (69). Se ha propuesto que *Cthrc1* favorece el cierre de la herida al incrementar la migración de los fibroblastos y de los macrófagos M2 mediante la activación de la vía de TGF- β , pues el incremento de la abundancia de la proteína CTHRC1 es proporcional a la fosforilación de los efectores Smad2/3 (69). A partir de estos hallazgos, se ha propuesto que en el proceso de reparación tisular, *Cthrc1* promueve la migración tisular y participa en la vía de señalización de TGF- β , que es fundamental en la regeneración tisular de *A. mexicanum* (70,71).

La relación de *Cthrc1* con la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor*, TGF- β , por sus siglas en inglés), se realizó a partir de su identificación por primera vez en arterias dañadas de modelos murinos, donde su expresión se inducía en respuesta a TGF- β (72,73). Posteriormente, se ha propuesto que CTHRC1 actúa como un regulador positivo de esta vía de señalización, ya que su incremento es directamente proporcional a la fosforilación de los efectores Smad2 y Smad3 (72,73). La

participación de CTHRC1 en la señalización de TGF- β sugiere que *Cthrc1* también podría estar vinculado al proceso de regeneración tisular en *A. mexicanum*, pues la activación de la vía de señalización es clave para la regeneración del apéndice caudal (70) y de la extremidad en *A. mexicanum* (71,74); durante la regeneración de ambas estructuras, tanto la expresión del transcrito del gen *Tgf- β* como la abundancia de la proteína que codifica aumentan en el blastema. La inhibición de esta vía, mediante inhibidores de los receptores de TGF- β , reduce la migración y proliferación celular en el blastema, lo que impide su formación o detiene su desarrollo, evitando así la regeneración del apéndice caudal (70) y de la extremidad (71,74).

1.13. El gen *Fstl1* está relacionado con el proceso de desarrollo

En humanos, el gen *FSTL1* codifica una proteína de la familia SPARC, que no actúa como un componente estructural de la matriz extracelular (ECM), sino que participa en su ensamblaje y deposición. Además, regula la actividad de las proteasas de la ECM y está involucrado en la señalización de factores de crecimiento (75), por ejemplo: en modelos murinos el gen *Fstl1* fue identificado por primera vez como un gen inducido en respuesta a TGF- β (76), y estudios posteriores han demostrado su implicación en la vía de señalización de las proteínas morfogenéticas óseas (*bone morphogenetic protein*, BMP, por sus siglas en inglés) durante el desarrollo (63).

Los niveles del transcrito del gen *Fstl1* y la abundancia de su proteína son más elevados en los pulmones y extremidades durante el desarrollo de modelos murinos (77). La expresión de *Fstl1* es fundamental para la supervivencia de los organismos, ya que su abatimiento impide la formación completa de la tráquea y de los alvéolos, lo que provoca el colapso pulmonar y la muerte de los organismos por fallo respiratorio poco después del nacimiento (63). Además, la expresión de *Fstl1* es indispensable para el desarrollo de las extremidades, pues la deficiencia de su expresión genera la curvatura del fémur y del cúbito, así como la fusión de los metacarpos (77). Dado que el fenotipo generado por la deficiencia de la expresión de *Fstl1*, es similar al observado en la deficiencia de los antagonistas de BMP, se ha estudiado la relación de *Fstl1* con esta vía de señalización (63,77). En modelos murinos en desarrollo, se ha demostrado que la proteína FSTL1 en los pulmones actúa como un antagonista de BMP compitiendo por la unión a los receptores tipo II y bloqueando la activación de los efectores Smad 1 y 5. Por esta razón, se ha propuesto que *Fstl1* desempeña un papel crucial en el desarrollo al regular la vía de señalización de BMP (63), la cual es clave para la formación y el mantenimiento del crecimiento del blastema durante la regeneración de extremidades de *A. mexicanum* (48).

1.14. El gen *ADAMTS17* codifica para metaloproteinasa de matriz extracelular

En humanos, el gen *ADAMTS17* codifica una metaloproteasa de la matriz extracelular (ECM), perteneciente a la familia de las desintegrinas y metaloproteinasas con motivo de trombospondina tipo 1 (ADAMTS), que es secretada hacia la ECM (78). Existen patologías asociadas con mutaciones en *ADAMTS17*. Tras evaluar el impacto de estas mutaciones en la proteína que codifica, se ha propuesto que *ADAMTS17* podría participar en la secreción de los elementos de la ECM (79), así como en el proceso de osteogénesis (62).

En particular, en el síndrome de Weill-Marchesani (Weill-Marchesani syndrome 4, WMS4 por sus siglas en inglés), se han identificado mutaciones autosómicas recesivas en

ADAMTS17 que impiden la secreción de la proteína a la ECM (79). Como consecuencia, los fibroblastos de los individuos afectados acumulan proteínas de la ECM, como fibrilina I, fibronectina y colágeno I, lo que sugiere que *ADAMTS17* podría estar relacionada con el proceso de la secreción de proteínas de la ECM (79). Para profundizar en esta hipótesis, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida de *ADAMTS17* en la línea celular HEK293, para introducir las mutaciones presentes en WSM4. El resultado fue un incremento de la abundancia de las proteínas fibrilina I, fibronectina y colágeno en lisados celulares, mientras que en el medio extracelular la abundancia de estas proteínas era menor en comparación con las células no mutadas (79). Estos hallazgos refuerzan la idea de que el gen *ADAMTS17* podría participar en los procesos de la ECM, particularmente en la secreción de determinadas proteínas.

En conjunto, los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1* podrían ser candidatos clave en la regeneración del autopodio de *A. mexicanum*, ya que su expresión en el blastema a los 10 dpa en organismos de 8 meses que regeneran el autopodio es opuesta a la observada en organismos de 8 años que no presentan regeneración (3). Por otro lado, se ha reportado previamente que la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1* es mayor en el blastema a los 10 dpa en comparación con el autopodio (3). No obstante, diversos estudios indican que los cambios transcripcionales fluctúan en ciertos períodos temporales del proceso de regeneración. En particular, se desconocen los cambios transcripcionales de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1* entre los 9 y 24 dpa, un periodo en el que ocurre la mayor cantidad de cambios transcripcionales en el blastema (37,55). A partir de estos antecedentes, la evaluación de la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1* en blastemas formados entre los 9 y 24 dpa podría proporcionar información relevante sobre su comportamiento transcripcional en distintas etapas del proceso de regeneración del autopodio de *A. mexicanum*.

En conjunto, el estudio del blastema ha evidenciado que la regeneración de extremidades en *A. mexicanum* es un proceso complejo, caracterizado por cambios transcripcionales dinámicos en periodos específicos, particularmente entre los 9 y 24 días postamputación (dpa) (4,5). Por ello, evaluar la actividad transcripcional en este intervalo permitiría evaluar el comportamiento transcripcional de genes clave en la regeneración. Estudios previos han sugerido que *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* podrían desempeñar un papel fundamental en la regeneración del autopodio, ya que presentan patrones de expresión opuestos entre organismos de 8 meses, que regeneran, y organismos de 8 años, que no lo hacen. Además, se ha reportado que en el blastema de 10 dpa de organismos jóvenes, la expresión de estos genes cambia en respuesta al proceso regenerativo. Sin embargo, se desconoce su comportamiento transcripcional en la fase en la que el blastema experimenta los mayores cambios transcripcionales, así como los posibles elementos de regulación que controlan su expresión. A partir de estos antecedentes, este estudio plantea preguntas sobre la dinámica de expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* entre los 9 y 24 dpa durante la regeneración del autopodio en organismos de 8 meses y 8 años, así como sobre los elementos de regulación transcripcional asociados a estos genes.

2. Planteamiento del problema

En el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*, se forma el blastema, una masa celular originada a partir de procesos de dediferenciación y rediferenciación celular, que permite la regeneración de los tejidos perdidos (5,20). Durante este proceso, la mayor cantidad de cambios transcripcionales ocurre en el blastema entre los 9 y 24 dpa, donde la expresión de algunos genes clave para el proceso de regeneración cambia de tal manera que, si se sobreexpresan en un día específico, en días posteriores se subexpresan y viceversa (4,17,54). Por ejemplo: *Hoxa13* se sobreexpresa en el blastema a los 9 dpa pero a los 13 dpa se sobreexpresa (17), mientras que *Hoxd13* se sobreexpresa en el blastema a los 10 y a los 21 dpa se subexpresa (54). Estos hallazgos sugieren que otros genes clave para el proceso de regeneración de extremidades podrían modificar su expresión en blastemas formados entre los 9 y 24 dpa.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* podrían ser clave en el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*, ya que su expresión es opuesta entre organismos de 8 meses de edad que regeneraron el autopodio amputado y organismos de 8 años que no presentaron regeneración; particularmente, en comparación con el autopodio *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* se sobreexpresan en el blastema de 10 dpa de organismos de 8 meses. Por el contrario, estos genes se subexpresan en el autopodio de organismos de 8 años (3). Sin embargo, se desconoce el comportamiento transcripcional de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* durante el proceso de regeneración entre los 9 y 24 dpa. Es por ello que, en este trabajo se retoman los antecedentes, para validar la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el blastema de 10 y para estudiar su expresión en una nueva etapa en el blastema de 20 dpa en organismos de *A. mexicanum* de 8 meses, así como para evaluar expresión de estos genes en el autopodio de *A. mexicanum* de 8 años y de 8 meses de edad.

3. Preguntas de investigación

¿Cuál es la expresión de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el blastema a los 10 y 20 dpa del autopodio de organismos de 8 meses de edad? y ¿cómo se compara la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el autopodio de *A. mexicanum* de 8 años y de 8 meses de edad?

4. Hipótesis

Si en *A. mexicanum* de 8 meses de edad la expresión de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* es mayor en el blastema a los 10 dpa, entonces se observará una expresión inversa en el blastema a los 20 dpa. Mientras que si la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* es mayor en el autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad, entonces su expresión será inversa en el autopodio de los organismos de 8 años.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Realizar la caracterización *in silico* de elementos de regulación transcripcional y analizar la expresión de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el proceso de regeneración del autopodio de *A. mexicanum* de 8 años y de 8 meses de edad.

5.2. Objetivos específicos

1. Identificación de la región promotora de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* de *A. mexicanum* mediante análisis *in silico* de islas CpG, enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3.
2. Búsqueda *in silico* de los motivos de unión para factores de transcripción en la región promotora de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* de *A. mexicanum*.
3. Evaluar la expresión de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el tejido del autopodio y en el blastema formado a los 10 y 20 días después de la amputación del autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad y en el tejido de autopodio de *A. mexicanum* de 8 años de edad.
4. Determinar la abundancia de la proteína ADAMTS17.1 en el tejido de autopodio y en el tejido de blastema formado a los 10 y 20 días después de la amputación del autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad.

6. Materiales y métodos

6.1. Organismos empleados

Se emplearon un total de 12 organismos de *A. mexicanum* pertenecientes a la colonia mantenida por el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC) perteneciente a la UAM Xochimilco. Todos los organismos empleados tenían 8 meses de edad con una longitud de 13-15 cm (del apéndice caudal a la punta de la cabeza) y presentaban el fenotipo silvestre con una pigmentación verde parda (Figura 1). Los organismos se mantuvieron en las instalaciones del CIBAC, en recipientes de plástico separados, con agua filtrada de los Canales de Xochimilco, oxigenación a temperatura ambiente durante los meses de septiembre y noviembre. Adicionalmente, se emplearon muestras de tejido de autopodio de dos organismos de *A. mexicanum* silvestres de 8 años de edad también pertenecientes a la colonia del CIBAC, los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones que los organismos de 8 meses de edad.

De los organismos de 8 meses de edad se amputó el autopodio de la extremidad anterior izquierda, posteriormente se formaron dos grupos, cada uno con cinco organismos distintos: de un grupo se obtuvo el blastema de 10 dpa en el mes de septiembre (n=5,) y del otro grupo se obtuvo el blastema de 20 dpa en el mes de noviembre (n=5) (Figura 7). En este trabajo, se incluyeron las muestras de tejido del autopodio obtenidos anteriormente por nuestro grupo de trabajo, provenientes de organismos de 8 años de edad (n=2) los cuales no formaron blastema en comparación con los organismos de 8 meses de edad (3).

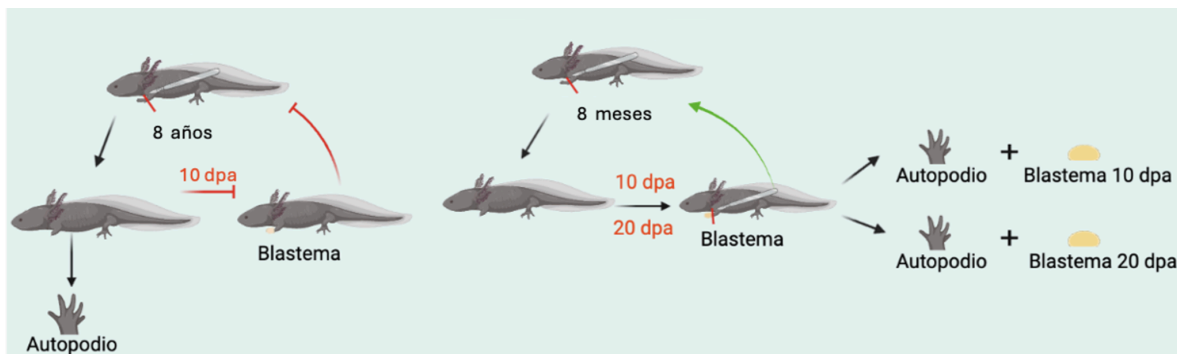


Figura 7. Esquematización del proceso de recolección de muestras de los diferentes organismos empleados. De *A. mexicanum* de 8 meses de edad, se amputó el autopodio y después de 10 o 20 días se recolectó el blastema. Para los organismos de 8 años de edad, sólo se incluyó el tejido de autopodio anteriormente recolectado por Del Moral-Morales y colaboradores (3). Elaborada con Biorender.com.

Este trabajo fue aprobado por el comité de ética en investigación (CEI) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (CEI.2023.007). La toma de muestras biológicas de los organismos se llevó a cabo bajo la supervisión de los médicos veterinarios adscritos al CIBAC bajo los procedimientos establecidos de la UMA CIBAC, UAM-Xochimilco (Registro DGVS-CR-IN-0952-DF/07), de acuerdo a la Ley General de Vida Silvestre.

6.2. Protocolo de anestesia y de amputación

Para realizar la amputación del autopodio y del blastema los organismos fueron anestesiados con benzocaína al 0.03% (Sigma-Aldrich), la cual se disolvió en un recipiente

que contenía agua de los humedales de Xochimilco. Una vez que los organismos no presentaban movimiento, se retiraron del agua para realizar las amputaciones del autopodio con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi 305 trino, Zeiss). Posteriormente, para la toma de muestra de los blastemas se siguió el mismo procedimiento de anestesia antes descrito. Después de cada toma de muestras, los organismos fueron transferidos a otros recipientes con agua de los humedales de Xochimilco y con aireación para su recuperación. Las muestras de tejido fueron preservadas en RNAlater (Invitrogen, AM7024) y almacenadas -80°C.

6.3. Extracción de ARN y diseño de oligonucleótidos sintéticos para PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN se extrajo de las muestras de tejido de los organismos adultos jóvenes y de los organismos viejos mediante el método de Trizol (Invitrogen, No. catalogo: 15596026), lo cual se describe detalladamente en el anexo 12.1. Posteriormente se evaluó la calidad mediante la medición del número de integridad del ARN (*ARN Integrity Number*, RIN, por sus siglas en inglés) en el Agilent Bioanalyzer System (Agilent Technologies) (Figura 8). Este sistema usa electroforesis para evaluar la proporción del ARN ribonuclear 18S y 28S en la muestra; a medida que incrementa la degradación de la muestra, la abundancia del ARN ribonuclear 18S y 28S, al igual que el valor del RIN disminuye. Por lo tanto, los valores de RIN de 1, indica degradación del ARN, mientras que valores de entre 8 a 10 indican una buena integridad del ARN (80). El ARN obtenido de los tejidos del autopodio y del blastema de 10 y 20 dpa fue de buena calidad.

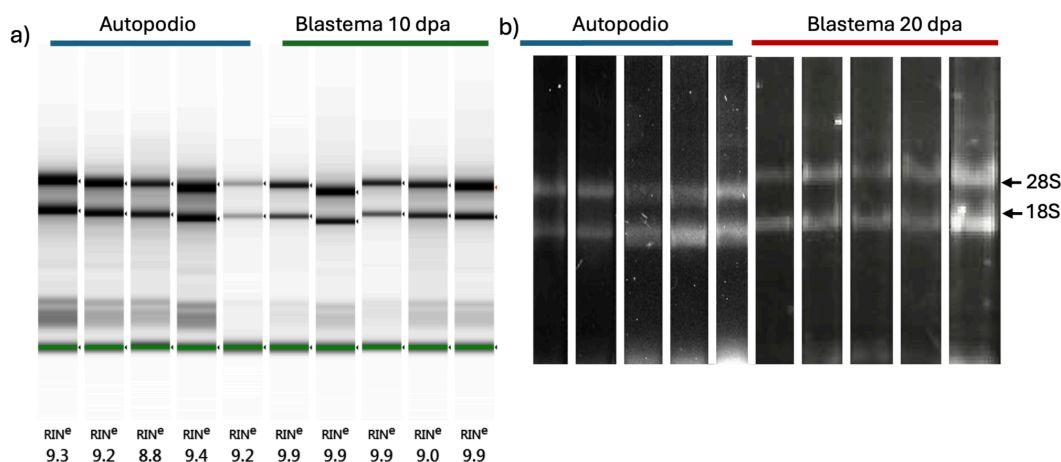


Figura 8. Geles de electroforesis para la evaluación de la calidad de ARN. a) Gel de electroforesis obtenido mediante Agilent Bioanalyzer System de las muestras de autopodio y de blastema de 10 dpa, con los respectivos valores de RIN según la proporción del ARN ribosomal 18S/28S. b) Gel de electroforesis de las muestras autopodio y del blastema de 20 dpa donde se observan las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S.

A partir de 200 ng de ARN se generó el DNA complementario (complementary DNA, DNAC por sus siglas en inglés) mediante una reacción de retrotranscripción con oligos random, según las indicaciones del proveedor del kit GeneAmp® RNA PCR Core Kit (Applied Biosystem, No. catálogo: N8080143). El DNAC se usó para evaluar la expresión de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, *Cthrc1.1* y *Gapdh* en el autopodio de los organismos

de 8 meses y 8 años, así como en los blastemas de 10 y 20 dpa mediante RT-qPCR cuantitativa (*real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR por sus siglas en inglés). Para ello, se diseñaron oligos sintéticos específicos para cada gen, lo cual se explica a continuación.

A partir de la secuencia codificante (*coding sequence*, CDS por sus siglas en inglés) de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, *Cthrc1.1* y *Gapdh* reportada en genome.axolotl-omics.org, se diseñaron los oligonucleótidos sintéticos empleados para los ensayos de RT-qPCR mediante la herramienta Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) con los siguientes parámetros: longitud mínima del oligo 18 pb, longitud máxima del oligo 20 pb. Los oligos resultantes fueron seleccionados según su complementariedad con la región 3' del CDS, inicio de la secuencia con GC, el tamaño del amplicón resultante (<170 pb) y su especificidad al gen blanco. Esto último se evaluó mediante el alineamiento global de los oligonucleótidos sintéticos contra el CDS en BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los oligonucleótidos sintéticos seleccionados se muestran en la Tabla 2 y su localización en la secuencia del gen se encuentra en el Anexo 12.3.

Tabla 2. Oligonucleótidos sintéticos empleados para los ensayos de RT-qPCR

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia (5' → 3')	T _m (°C)	Amplicón esperado (pb)	ID del gen
<i>Adamts17.1</i>	Forward	CTGCTCTGACC TACAAGTGC	60	130	AMEX60DD 201003517.1
	Reverse	TTGGCATAAAA GTCTCGGCA			
<i>Fstl1</i>	Forward	ACGAGACAGC CATCAACATC	60	117	AMEX60DD 201046943.1
	Reverse	TCAGCTTCCA GTCTGCATTC			
<i>Gpx7</i>	Forward	CCTTCCCCATG TTCAGCAAA	60	140	AMEX60DD 301019607.1
	Reverse	GTTCTCCACCT TTCCATCGG			
<i>Cthrc1.1</i>	Forward	GCCTCGAGTT CAATTCCACT	60	90	AMEX60DD 301040253.1
	Reverse	CCACGTCCAC TAAACCAGAG			

<i>Gapdh</i>	Forward	GCTGCCTCCTA TGACGAAAT	60	84	AMEX60DD 201026859.1
	Reverse	TTCCTCGGTGT ATCCCAGAA			

6.4. Evaluación transcripcional de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*

La expresión de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el autopodio de los organismos de 8 meses y 8 años de edad, así como en los blastemas de 10 y 20 dpa, fueron evaluados mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, No. de catálogo: K0222) en el termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

La expresión relativa de cada gen se determinó mediante el análisis de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que consiste en la normalización de la expresión de cada gen respecto a un gen de expresión constitutiva, como *Gapdh*. Posteriormente, se comparó la expresión de cada gen en la condición de interés con su expresión en la condición control (81). De esta manera, la expresión relativa de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el autopodio de organismos de 8 años (n=2), así como en los blastemas de 10 (n=5) y 20 dpa (n=5), se obtuvo comparándolos con la condición control del autopodio de organismos de 8 meses (n=10). En ambos casos, los resultados reportados son el promedio de tres réplicas técnicas de cada una de las réplicas biológicas. Posteriormente, en Graphpad se evaluó la homocedasticidad de los datos mediante una prueba F y con base en ello se decidió realizar los análisis estadísticos mediante una prueba Mann-Whitney.

6.5. Caracterización *in silico* del promotor de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*

Con el objetivo de identificar elementos de regulación transcripcional para los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* de *A. mexicanum*, se determinó la región promotora de cada gen y los motivos de unión para factores de transcripción mediante métodos *in silico*. Como a continuación se describe, primero la región promotora se identificó, mediante la búsqueda elementos característicos de esta región en vertebrados, tales como: islas CpG y del enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 4 en el histona 3 (H3K4me3) (82). Una vez identificada la región promotora de cada gen, se identificaron los motivos de unión para TF en el promotor de cada gen. A continuación se describen las particularidades de cada análisis.

6.5.1. Identificación de la región promotora de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*

El genoma de los vertebrados se caracteriza por presentar una baja frecuencia de dinucleótidos CpG (una citosina seguida de una guanina). En cambio, en algunas regiones la frecuencia de dinucleótidos CpG, así como el contenido de citosinas y guaninas es mayor al 67% respecto al genoma, dichas regiones se conocen como islas CpG y se encuentran en

el 70% de los promotores de los vertebrados (82–84). Debido a esto, la búsqueda de islas CpG se emplea para la identificación de regiones promotoras. Los promotores también se caracterizan por presentar marcas de modificaciones postraduccionales de histonas, como la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3), que suele encontrarse en promotores transcripcionalmente activos (85). Con base en estos datos, en este trabajo se consideró que la región en la que una isla CpG co-localiza con el enriquecimiento de la marca de histonas H3K4me3, era el promotor de cada gen.

La búsqueda de islas CpG se realizó en la región comprendida entre los 1000 pb río arriba y río abajo a partir del sitio de inicio de la transcripción (*transcription start site*, TSS, por sus siglas en inglés) de los genes *Adamts17*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*. Para ello se usó Methyl Primer Express® Software (Applied Biosystems) con los parámetros propuestos anteriormente por diversos autores (83,86): longitud mínima de 500 pb, longitud máxima de 2000 pb, %GC > 55 y proporción de GCobservada/esperada > 0.65.

El enriquecimiento de la marca de histonas H3K4me3, también se evaluó en la región comprendida entre los 1000 pb río arriba y río abajo a partir del TSS de los genes *Adamts17*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*. Para ello se emplearon datos de inmunoprecipitación de la cromatina (*chromatin immunoprecipitation*, ChIP, por sus siglas en inglés) de la marca de histonas H3K4me3 del blastema a lo 13 dpa y del autopodio. Los datos empleados están disponibles en la base de datos de *Gene Expression Omnibus* (número de acceso: GSE217594) (17).

6.5.2. Búsqueda de motivos de unión para factores de transcripción en el promotor de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*

A partir de la base de datos central de vertebrados conocida como JASPAR (a database of transcription factor binding profiles; <https://jaspar.elixir.no/>) se obtuvieron las secuencias o motivos de unión de unión a TFs en organismos vertebrados. Los motivos de unión para TF se buscaron en el promotor de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* mediante el software FIMO (87). En la selección de los motivos de unión, no se consideró la especie de los organismos de origen, sino que se priorizaron los motivos con un valor de p ajustado < 0.01, el cual en FIMO se representa por el valor q. Además, para los motivos de unión de un mismo TF, se seleccionó el motivo con el mayor score y con mayor significancia.

6.6. Evaluación de la proteína ADAMTS17, mediante las técnicas de *Western Blot* e inmunohistoquímica

Para evaluar la abundancia de la proteína ADAMTS17 en el blastema y autopodio de *A. mexicanum* de 8 años de edad, primero se realizaron ensayos de *Western blot* e inmunohistoquímica en diversos tejidos de *A. mexicanum* y líneas celulares.

6.6.1. Selección del anticuerpo contra la proteína ADAMTS17 y análisis de su masa molecular

Hasta donde sabemos, la proteína ADAMTS17 no ha sido evaluada en *A. mexicanum*, por lo que su masa molecular se desconoce en esta especie. Debido a esto, estimamos la masa molecular de esta proteína a partir de su secuencia de residuos de aminoácidos en *A.*

mexicanum mediante el software Compute pI/Mw del Instituto Suizo de Bioinformática (https://web.expasy.org/compute_pi/). El resultado de este análisis fue una masa molecular de 123.43 kDa, la cual se consideró como la masa molecular esperada para ADAMTS17 de *A. mexicanum*.



6.6.2. Cultivo celular

Tabla 3. Condiciones empleadas para el cultivo de líneas celulares

Línea celular	Origen	Medio de cultivo
MCF-7	Adenocarcinoma de la glándula mamaria.	DMEM/F-12 adicionado con 10% de suero fetal bovino.
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de la glándula mamaria.	
SK-OV-3	Adenocarcinoma de ovario.	
HEK-293	Hígado.	

* Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

6.6.3. Extracción de proteínas empleadas para los ensayos de *Western blot*

En los ensayos de *Western blot* se emplearon extractos de proteínas totales del tejido del autpodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad y de las líneas celulares mencionadas en la tabla 3. El tejido del autpodio se empleó debido a que la cantidad de tejido es mayor que la del blastema, lo cual facilita la extracción de las proteínas. MCF-7 se utilizó porque la proteína ADAMTS17 se ha identificado previamente en esta línea celular (78), mientras que HEK-293, MDA-231 y SK-OV-3 se incluyeron debido a su disponibilidad en el laboratorio, además de acuerdo a la base de datos The Cancer Cell Line Encyclopedia estas líneas celulares expresan en mayor medida al gen *ADAMTS17* en comparación con otras líneas celulares (Figura 9).

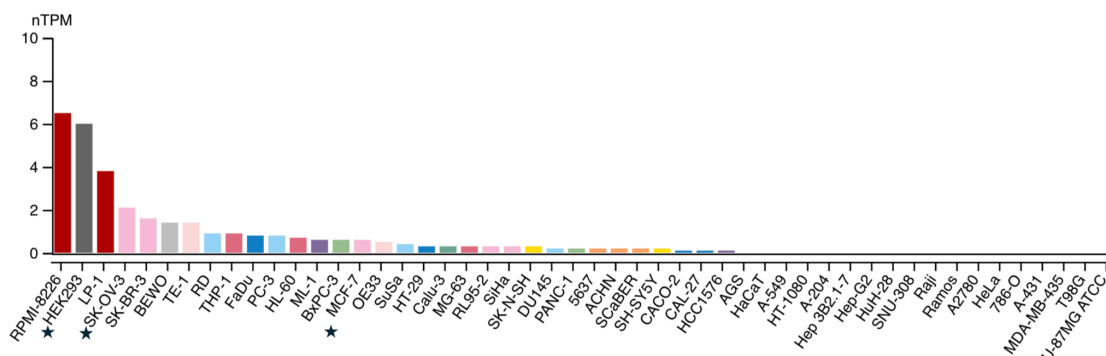


Figura 9. Histograma que muestra la expresión del gen *ADAMTS17* en distintas líneas celulares neoplásicas. La expresión del gen se muestra según el número de transcritos por millón (nTPM) obtenidos mediante RNA-Seq. Las líneas celulares empleadas en este trabajo están señaladas con una estrella. Esta imagen se obtuvo de la base de datos The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140470-ADAMTS17/cell+line>).

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron con buffer RIPA (50 mM NaCl, 50 mM NaF, 12 mM desoxicolato de sodio, 3.5 mM dodecil sulfato de sodio, 1.6 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM Tris-HCl, 16.5 mM Triton X-100, 1 mM ortovanadato de sodio) y fueron cuantificados mediante el método de Bradford con Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, No. catálogo: #500-0006). Los extractos fueron separados mediante electroforesis, en condiciones desnaturizantes, en geles de poliacrilamida-bisacrilamida al 10% a un voltaje

de 100 V por una hora y treinta minutos. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante transferencia semi-seca durante 1 hora a 20 V. La membrana se bloqueó por 1 hora a temperatura ambiente con leche baja en grasa al 6% en TBS-Tween 0.05% y se incubó con los siguientes anticuerpos primarios durante una noche a 4°C: ADAMTS17 (1:750, Q-12 Santa Cruz Biotechnology, No. catálogo: sc-100480) y β -actina (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, No. catálogo: sc-47778) (Anexo 12.2). Finalmente, el anticuerpo secundario se incubó durante una hora a temperatura ambiente (1:15000, Santa Cruz Biotechnology, No. catálogo: sc-2005).

6.6.4. Inmunohistoquímica

Como un segundo método para la estandarización del anticuerpo anti-ADAMTS17, se empleó el método de inmunohistoquímica. El procesamiento de los tejidos y el protocolo de inmunohistoquímica se realizó en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) bajo la supervisión del Dr. Carlo César Cortés González. Como control se incluyeron tejidos de hígado de *A. mexicanum* CIBAC del CIBAC y de humanos del INCan embebidos en parafina, ya que, según la información obtenida de la página *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) el hígado es el segundo tejido con mayor expresión del gen *ADAMTS17* (Figura 10). Además, se ha identificado la presencia de la proteína ADAMTS17 en este tejido. (78).

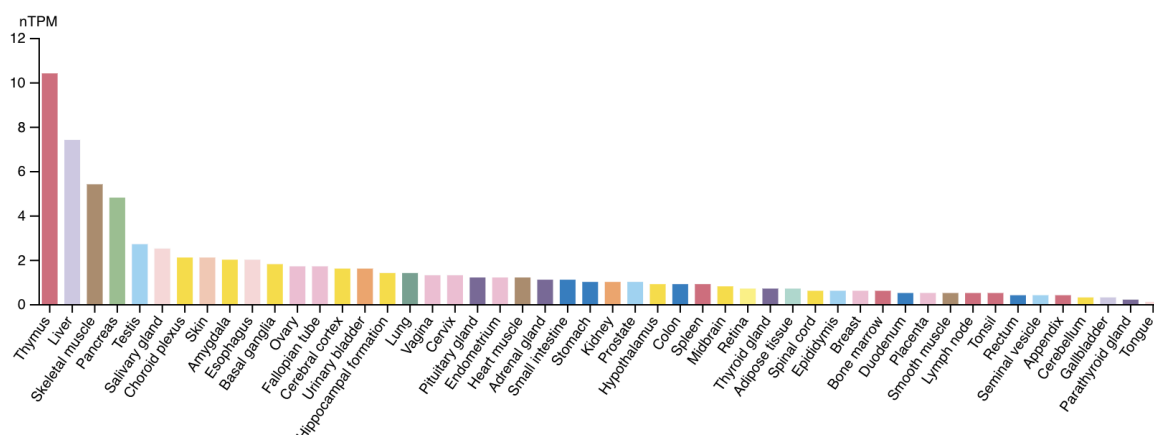


Figura 10. Histograma que muestra la expresión del gen *ADAMTS17* en distintos tejidos de humanos. Se muestra la expresión consenso del gen según el número de transcritos por millón (nTPM) obtenidos mediante RNA-Seq de distintos tejidos de humanos. Esta imagen se obtuvo de la base de datos The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140470-ADAMTS17/tissue>).

Del tejido de hígado de humano y de *A. mexicanum* embebidos en parafina, se realizaron cortes de 5 μ m en un microtomo (Hyrax M25, ZEISS). Los cortes de tejido fueron montados en portaobjetos cargados Ultracruz® Microscope Slides positive charge (Santa Cruz Biotechnology), posteriormente se realizó la inmunohistoquímica con el equipo BenchMark GX (Roche) perteneciente al INCan, el cual realiza un procedimiento automatizado de inmunohistoquímica para diagnóstico clínico. El procedimiento consiste en: 1) eliminar la parafina de los tejidos al calentar los portaobjetos a 76 °C; 2) recuperar el antígeno a 100°C; 3) inhibir a las peroxidasas endógenas del tejido, para evitar la oxidación del cromógeno; 4) incubación del anticuerpo primario durante 32 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos empleados fueron: ADAMTS-17 (1:250, Q12 Santa Cruz

Biotechnology, No. catálogo: sc-100480) y β -actina (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, No. catálogo: sc-47778), diluidos en TBS-Tween 1x con leche baja en grasa al 1x; 5) incubación del anticuerpo secundario por 8 minutos; 6) incubación con el cromógeno diaminobencidina por 8 minutos. Posteriormente para marcar los núcleos celulares, se realizó una tinción con hematoxilina por 5 minutos, el exceso de hematoxilina fue lavado con agua corriente y etanol al 96%. Por último se realizó un tratamiento de carbonato de litio por un minuto para cambiar el color púrpura de la hematoxilina a un color azul. Los portaobjetos se observaron con el microscopio óptico en campo claro (AxioScan Z1, ZEISS) de la Unidad de Microscopía del INCAN.

7. Resultados

7.1. Identificación del promotor tentativo de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*

Hasta donde sabemos, los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* no han sido caracterizados en *A. mexicanum*, por lo que se desconocen los elementos de regulación transcripcional relacionados con estos genes. Es por ello que en este trabajo se identificaron de manera bioinformática a los promotores tentativos de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en *A. mexicanum*. Para ello en la región entre los 1000 pb río arriba y río abajo del TSS de cada gen se realizó la búsqueda de islas CpG, además se evaluó el enriquecimiento de la marca de histonas H3K4me3 en el autopodio y el blastema a los 13 dpa (17). Dado que en mamíferos los genes con expresión constitutiva suelen tener promotores con alta densidad de islas CpG (84), se incluyó el gen *Gapdh* de *A. mexicanum* como control positivo para validar el método de búsqueda de islas CpG. Como esperábamos, se observó que el gen *Gapdh* presenta una isla CpG alta que co-localiza con el enriquecimiento de H3K4me3 (Tabla 4), lo que confirma que el método empleado permite identificar *in silico* las islas CpG.

Tabla 4. Enriquecimiento de la marca de histonas H3K4me3 y tipo de islas CpG en el promotor de los genes *Gapdh*, *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* de *A. mexicanum*

Gen	Enriquecimiento de H3K4me3 en el autopodio y blastema a los 13 dpa	Isla CpG		
		Longitud (pb)	%GC	Isla CpG
<i>Gapdh</i>	Sí	1970	56.45	Sí
<i>Adamts17.1</i>	Sí	1100	57.91	Sí
<i>Fstl1</i>	Sí	650	58.15	Sí
<i>Gpx7</i>	Sí	980	53.93	Sí
<i>Cthrc1.1</i>	No	-	-	No

Para el caso de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1* y *Gpx7* se identificaron islas CpG. Estos genes, también presentaron enriquecimiento de la marca de histonas H3K4me3 en el autopodio y el blastema a los 13 dpa, el cual co-localiza con las islas CpG de cada gen. Por el contrario, en el gen *Cthrc1.1* no se identificaron islas CpG, mientras que su enriquecimiento en H3K4me3 fue nulo en el blastema a los 13 dpa y mínimo en el autopodio, en comparación con *Adamts17.1*, *Fstl1* y *Gpx7* (Tabla 4 y Anexo 12.4). Esto sugiere que *Cthrc1.1* no presenta un enriquecimiento significativo de H3K4me3 en la región analizada, sin embargo, es posible que esta marca postraducciona se localice en regiones más distales al TSS (88). A partir de estos resultados, la región donde se observó la co-localización entre

islas CpG y el enriquecimiento de H3K4me3 en *Adamts17.1*, *Fstl1* y *Gpx7* se consideró como el promotor tentativo de estos genes. Por el contrario, dado que en *Cthrc1.1* no se identificaron islas CpG ni enriquecimiento de H3K4me3, se consideró como promotor tentativo a la región comprendida entre los 1000 pb río arriba y río abajo del TSS.

7.2. Los factores de transcripción con motivos de unión en el promotor de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*

Una vez identificados los promotores tentativos de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*, nos cuestionamos sobre qué factores de transcripción pudieran estar relacionados con la regulación transcripcional de estos genes. Para resolver esta pregunta se realizó una búsqueda de los motivos de unión para TF en el promotor tentativo de estos genes mediante un abordaje *in silico*. A partir de este análisis, se encontraron 16 motivos de unión en *Adamts17.1*, 14 para *Fstl1*, 13 en *Gpx7* y sólo 3 para *Cthrc1.1* (Figura 11).

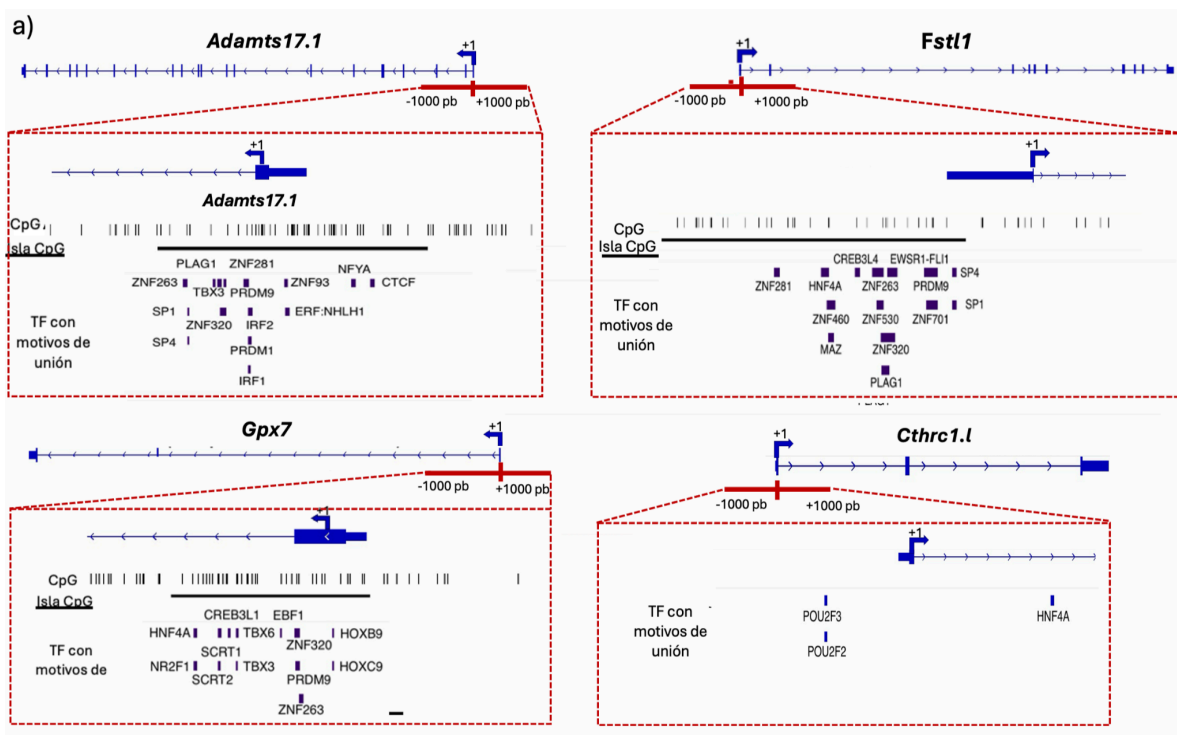


Figura 11. Caracterización *in silico* de los motivos de unión para factores de transcripción en el promotor de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* de *A. mexicanum*. Se muestran los dinucleótidos CpG (rectángulos en color negro) y la isla CpG (línea horizontal en color negro) en la región comprendida entre los 1000 pb río arriba y río abajo del TSS de cada gen. Además, se muestran los motivos de unión para TF en la isla CpG del promotor de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*. En el caso de *Cthrc1.1*, la búsqueda de los motivos de unión se realizó entre los 1000 pb río arriba y río abajo a partir del TSS. Los motivos de unión encontrados en la región promotora son aquellos con un valor de p ajustado < 0.001.

De los TF con motivos de unión en el promotor de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*, destacan aquellos que están relacionados con el proceso de desarrollo en vertebrados, como los TF de la familia Hox (HOXB9 y HOXC9) (89), aquellos de la familia ZNF (ZNF93, ZNF460, ZNF460, ZNF530 y ZNF701) (90), así como TBX3 (90–92). El TF POU2F2, también pertenece a la familia POU de TF relacionados al proceso de desarrollo de diversos organismos (93), incluyendo a *A. mexicanum* (94). También vale la pena mencionar a los

TF que están relacionados con mecanismos epigenéticos, como PRDM9 que funciona como una metiltransferasa encargada del establecimiento de las marcas de histonas H3K4me3 y H3K36me3 (95) y CTCF que participa en la organización tridimensional de la cromatina (96). En conjunto, estos resultados brindan información sobre los elementos de regulación transcripcional que podrían estar asociados a los cambios transcripcionales de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el proceso de regeneración del autopodio de *A. mexicanum*.

7.3. Evaluación de la expresión de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en blastemas formados a los 10 y 20 dpa durante la regeneración del autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad

Resultados reportados por nuestro grupo de trabajo sugieren que durante la regeneración del autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad, *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* se sobreexpresan en el blastema a los 10 dpa en comparación con el autopodio (3). Para analizar los cambios de expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* durante el proceso de regeneración, nos enfocamos en el periodo de los 9 a los 24 dpa, cuando el blastema presenta la mayor cantidad de cambios transcripcionales (4,54). Es por ello que en este trabajo se evaluó la expresión de estos genes en el blastema a los 10 y 20 dpa del autopodio de organismos de 8 meses de edad mediante RT-qPCR.

En nuestro análisis, el autopodio representa la condición basal en la que no se esperan cambios en la expresión de cada gen ($2^{-\Delta\Delta Ct}=1$). Por el contrario, en comparación con el autopodio, en el blastema a los 10 dpa la expresión de *Adamts17.1* es significativamente mayor, mientras que la expresión de *Fstl1* y *Gpx7* es significativamente menor. Por otro lado, la expresión de *Cthrc1.1* no muestra cambios significativos (Figura 12). Al evaluar estos genes en el blastema a los 20 dpa respecto al autopodio, encontramos que *Adamts17.1* y *Fstl1* presentan una expresión significativamente menor, mientras que *Gpx7* y *Cthrc1.1* tienden a disminuir, aunque no de forma significativa (Figura 12). Estos resultados sugieren que la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* cambia en respuesta a la amputación del autopodio, particularmente la expresión de *Fstl1* y *Gpx7* tiende a disminuir en el blastema, mientras que la expresión de *Adamts17.1* en el blastema a los 10 dpa es opuesta a su expresión en el blastema a los 20 dpa.

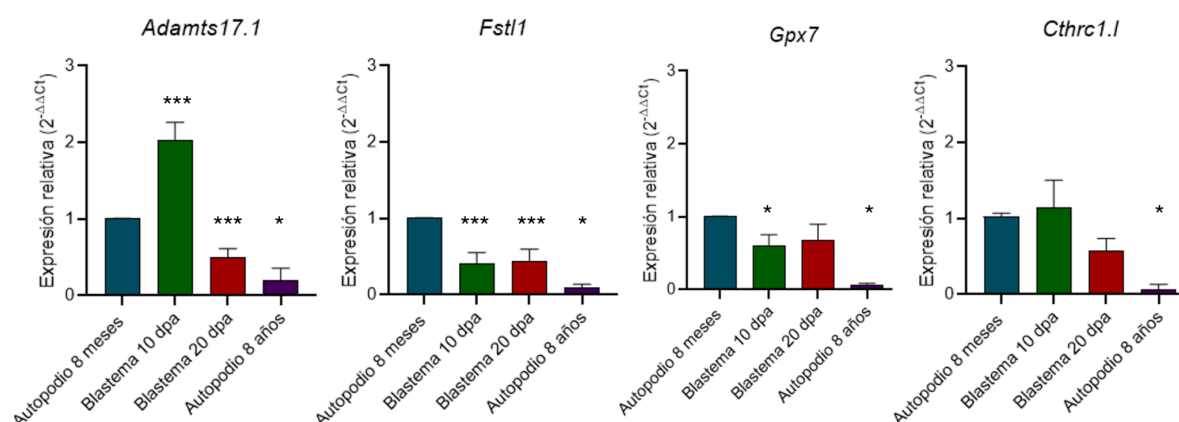


Figura 12. Histogramas que muestran la expresión relativa de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el blastema a los 10 y 20 dpa, así como en el autopodio de organismos de 8 meses y de 8 años de edad. La expresión de cada gen en el blastema a los 10 (n=5) y 20 dpa (n=5), al igual que el autopodio de

los organismos de 8 años (n=2) es relativa a su expresión en el autopodio de los organismos de 8 meses. En todos los casos, cada barra representa el promedio de tres replicados técnicos para cada réplica biológica. Se muestra el error estándar de la media. Prueba Mann-Whitney: *p<0.033, ***p<0.001.

7.4. Evaluación de la expresión de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses y 8 años de edad

Previamente nuestro equipo de trabajo ha propuesto que los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* podrían ser clave durante la regeneración del autopodio de *A. mexicanum*, pues estos genes se sobreexpresan en el blastema a los 10 días dpa en organismos de 8 meses y se subexpresan en el autopodio de organismos de 8 años, ambos en comparación con su expresión en el autopodio de organismos de 8 meses (3). A partir de estos antecedentes, en este trabajo evaluamos las diferencias en la expresión basal de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* entre estos organismos, por lo que analizamos su expresión en el autopodio de los organismos de 8 meses y 8 años de edad mediante RT-qPCR.

Los resultados muestran que, la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* es significativamente menor en el autopodio de los organismos de 8 años en comparación con el de los organismos de 8 meses (Figura 12). Estos resultados sugieren que la expresión basal de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el autopodio no mantiene la misma tendencia en organismos de distintas edades, por el contrario, tiende a disminuir en el autopodio de *A. mexicanum* de 8 años, los cuales de manera interesante no presentaron regeneración.

7.5. Evaluación de la proteína ADAMTS17 en el autopodio de *A. mexicanum*

Debido a que encontramos que la expresión del gen *Adamts17.1* en el blastema de 10 dpa es opuesta a su expresión al blastema de 20 dpa, decidimos explorar los cambios en el enriquecimiento de la proteína ADAMTS17 en las extremidades de *A. mexicanum* de 8 meses de edad y los blastemas de 10 y 20 dpa mediante *Western Blot* e inmunohistoquímica. Sin embargo, esto representó algunos retos técnicos que fueron difíciles de abordar. Uno de ellos, es que en el mercado no hay anticuerpos disponibles cuyo inmunógeno provenga de la proteína ADAMTS17 de *A. mexicanum*. Por el contrario, los únicos anticuerpos disponibles y a los que tuvimos acceso, reconocen a la proteína ADAMTS17 de humanos. Tal es el caso del anticuerpo empleado en este trabajo (Q-12 Santa Cruz Biotechnology, No. catálogo: sc-100480), por lo que primero evaluamos el anticuerpo en líneas celulares y tejidos humanos que sobreexpresan el gen *ADAMTS17* (Figura 9 y 10), además de incluir algunos tejidos de *A. mexicanum*.

En humanos, la proteína ADAMTS17 es secretada a la ECM donde es hidrolizada, por lo que su identificación mediante *Western blot* se caracteriza por la presencia de dos bandas: una banda con una masa molecular de 160 kDa y otra de 102.9 kDa (97,98). En las líneas celulares de cáncer de mama no se observó señal, mientras que en el tejido del autopodio de *A. mexicanum* se identificaron varias bandas: una banda con una masa molecular de 185 kDa y bandas inespecíficas por debajo de los 100 kDa (Figura 13a). Debido a que no se observaron las bandas correspondientes a ADAMTS17 en las líneas celulares y a que la señal en el autopodio era débil, se decidió incrementar la cantidad de proteína evaluada.

El incremento de la cantidad de proteína resultó en la identificación de un mayor número de bandas en el tejido del autopodio. Particularmente, la banda con una masa molecular de aproximadamente 40 kDa presentó el mayor enriquecimiento. En los modelos celulares, el incremento de la cantidad de proteína permitió observar señal; los modelos celulares de cáncer de mama (Figura 13b) presentaron un mayor número de bandas en comparación con los modelos celulares de hígado y de cáncer de ovario (Figura 13c). Al igual que en el autopodio de *A. mexicanum*, en todos los modelos celulares la banda con el mayor enriquecimiento tiene una masa molecular de aproximadamente 40 kDa, lo cual no concuerda con la masa molecular esperada para la proteína ADAMTS17 a partir de su secuencia de residuos de aminoácidos de *A. mexicanum* (123.43 kDa) o a la masa molecular reportada para la proteína de humano (160 kDa) (97,98).

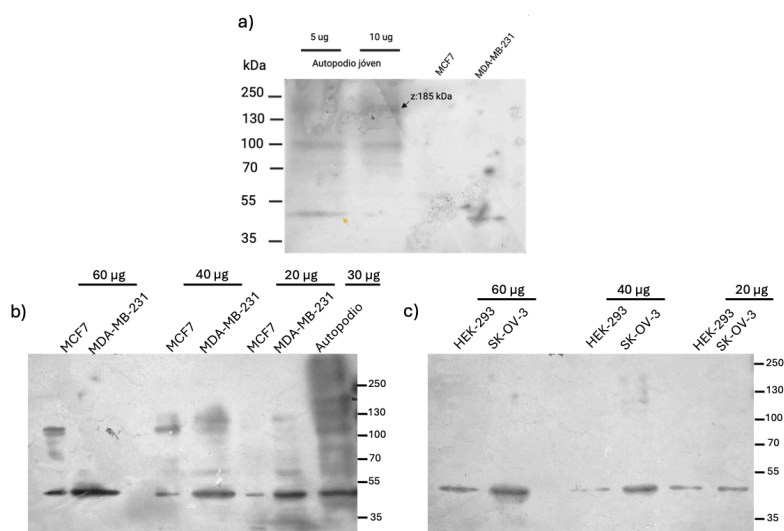


Figura 13. Western blot para la evaluación del anticuerpo anti-ADAMTS17 en el autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad y líneas celulares de humanas. a) Evaluación de la proteína ADAMTS17 en extractos totales de proteínas del tejido del autopodio de *A. mexicanum* y de líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7). b,c) Evaluación de la proteína ADAMTS17 con diferentes cantidades proteínas totales del autopodio, de líneas celulares de cáncer de mama, de hígado (HEK-293) y de cáncer de ovario (SK-OV-3).

Adicionalmente, empleamos la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la presencia de la proteína ADAMTS17 en *A. mexicanum*. Como control positivo empleamos el tejido de hígado humano, dado que este tejido presenta una alta expresión del gen *ADAMTS17* (Figura 10) y la proteína ha sido identificada en este tejido (78). A pesar de esto, no se observaron cambios en la señal de ADAMTS17 en el hígado humano respecto al control negativo (Figura 14a y c), por lo que se podría decir que no se identificó a ADAMTS17 en este tejido.

La ausencia de señal en el hígado humano podría deberse a errores técnicos. Para descartar esta posibilidad, evaluamos la expresión de la proteína β -actina, la cual presentó enriquecimiento en el citoplasma respecto al control negativo (Figura 14b y c). Estos resultados descartan que la ausencia de señal para ADAMTS17 en el hígado humano se debe a errores técnicos. Como una primera aproximación para la evaluación de la proteína ADAMTS17 de *A. mexicanum*, también se empleó el tejido de hígado. En el hígado de *A.*

mexicanum tampoco se observó que la señal de ADAMTS17 fuese mayor respecto al control negativo (Figura 14d y f), mientras que β -actina mostró enriquecimiento citoplasmático al igual que en el tejido de humano (Figura 14e). Estos resultados descartan la posibilidad de errores técnicos en la detección de ADAMTS17.

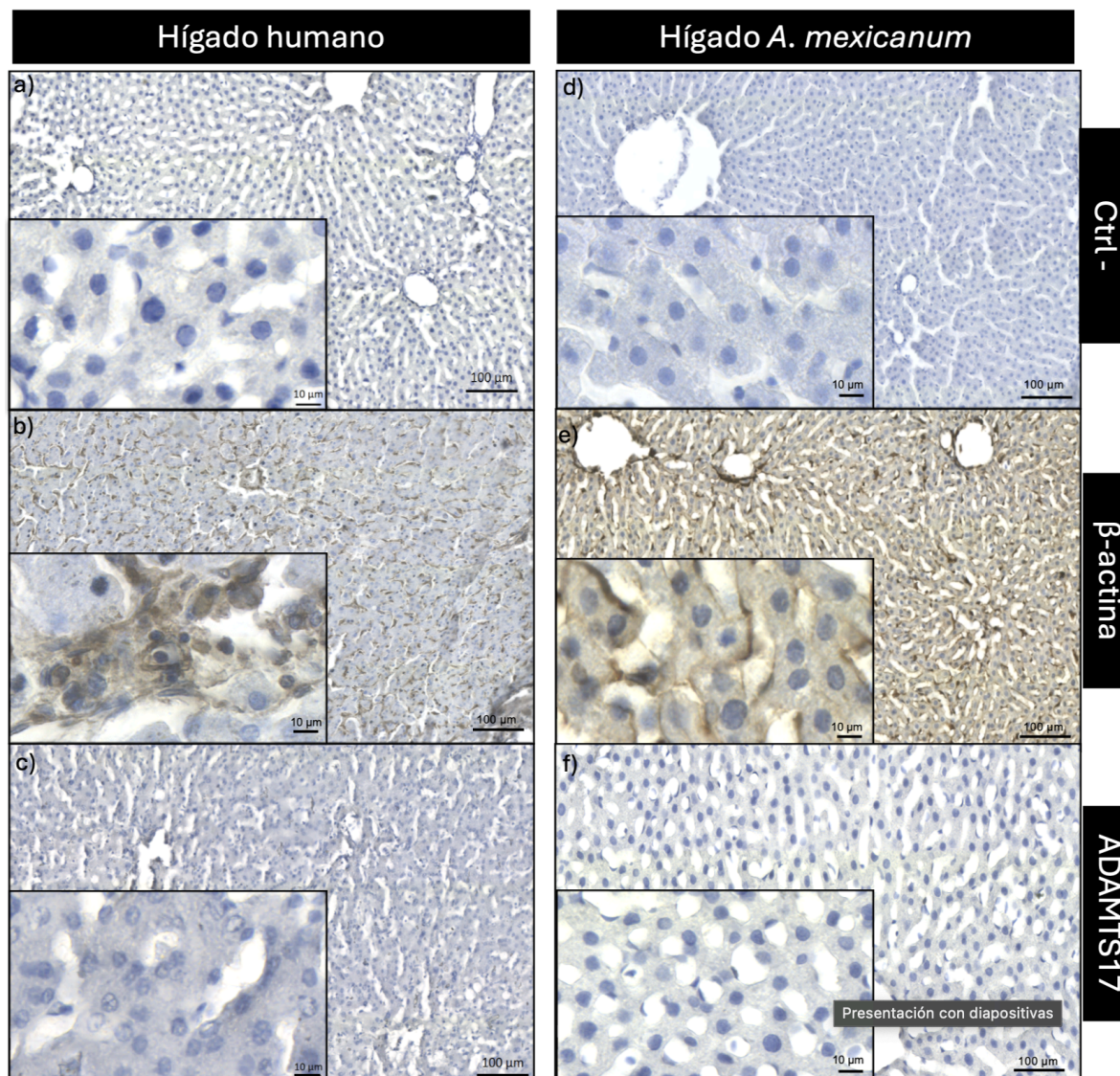


Figura 14. Micrografías de inmunohistoquímica para la evaluación de la presencia de la proteína ADAMTS17 en el tejido de hígado de humano y de *A. mexicanum*. a) y d) Control negativo, donde el anticuerpo primario no se incluyó. b) y d) Detección de β -actina. c) y f) Detección de ADAMTS17.

8. Discusión

A. mexicanum ha llamado la atención de la comunidad científica ya que este organismo tiene la capacidad de regenerar diversos órganos internos y extremidades completas (1). Debido a esto se ha convertido en el principal modelo para el estudio del proceso de regeneración tisular y se ha descrito que el proceso involucra la formación del epitelio de herida, de la capa epitelial apical y del blastema (39). El blastema ha recibido especial atención, ya que es una estructura formada por células indiferenciadas con alta capacidad proliferativa a partir de la cual se regeneran los tejidos y estructuras perdidas (5,39), por esta razón, los estudios sobre regeneración tisular se han enfocado en la evaluación del blastema. A pesar de que *A. mexicanum* es uno de los vertebrados con la mayor capacidad de regeneración tisular como adulto (1), esta capacidad disminuye con la edad, por ejemplo, la capacidad para regenerar el cristalino se pierde al final de la etapa larval (99,100). Esto también se ha reportado durante la regeneración de extremidades, cuando se amputa la misma extremidad cinco veces de manera consecutiva y a medida que el organismo envejece, el blastema deja de formarse e impide la regeneración de la extremidad (8).

Por este motivo, se ha propuesto que estudiar organismos que pierden la capacidad de regeneración tisular podría aportar información clave sobre los elementos esenciales para este proceso (5). En este contexto, previamente nuestro grupo de trabajo analizó las diferencias transcriptómicas entre *A. mexicanum* de 8 meses de edad, que regeneran el autopodio, y organismos de 8 años, que no presentan regeneración. Mediante análisis de expresión diferencial, identificamos que los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* están sobreexpresados en el blastema a los 10 dpa en comparación con el autopodio de organismos de 8 meses. En contraste, estos genes están subexpresados en el autopodio de organismos de 8 años (3). Estos hallazgos sugieren que *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* podrían desempeñar un papel crucial en la regeneración de extremidades en *A. mexicanum* (3).

En este trabajo, se retoman los antecedentes sobre la sobreexpresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el blastema de 10 dpa (3) para evaluar los cambios en la expresión de estos genes en distintas etapas del proceso de regeneración del autopodio. Para ello, analizamos la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el blastema a los 10 y 20 dpa en organismos de *A. mexicanum* de 8 meses, ya que estas etapas representan etapas clave del proceso de regeneración (37,55).

8.1. Los cambios en la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* durante el proceso de regeneración del autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad

Los cambios en la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el blastema de 10 y 20 dpa durante la regeneración del autopodio en *A. mexicanum* de 8 meses de edad, se pueden explicar mediante los cambios transcripcionales relacionados a los procesos celulares característicos de las distintas etapas del blastema. Durante la regeneración de extremidades, el blastema presenta cambios morfológicos y transcripcionales, lo que permite clasificarlo en dos etapas: blastema temprano y blastema tardío. Se ha sugerido que cada etapa del blastema se puede delimitar en días específicos, sin embargo, los periodos temporales de cada etapa varían entre estudios, por lo que no existe un consenso al respecto

(5,20,101–103). A pesar de las discrepancias, se ha propuesto que el blastema de 10 dpa representa la etapa temprana y el de 20 dpa la etapa tardía (102).

En nuestro trabajo, observamos que la expresión de *Adamts17.1* fluctúa entre el blastema temprano y tardío. Considerando que se ha propuesto que en *A. mexicanum* este gen codifica para una metaloproteasa de ECM (3), el incremento de su expresión en el blastema de 10 dpa en comparación con el autopodio, concuerda con los reportes realizados por otros estudios que sugieren que en el blastema temprano ocurre una extensa remodelación de la ECM e incremento de la expresión de genes codificantes para metaloproteasas de ECM, como *Mmp8* y *Mmp13* (32,35,37). Por el contrario, la disminución expresión de *Adamts17.1* en el blastema de 20 dpa coincide con hallazgos anteriores que indican que en el blastema tardío ocurren cambios transcripcionales relacionados al restablecimiento de la ECM (33,37). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la expresión de *Adamts17.1* podría estar relacionada con la transición del blastema temprano al tardío y resaltan la relevancia de los elementos de ECM en el proceso de regeneración del autopodio de *A. mexicanum*.

En contraste con la fluctuación en la expresión de *Adamts17.1* entre el blastema de 10 y 20 dpa, observamos que la expresión de *Gpx7* disminuyó en ambas condiciones. Debido a que *Gpx7* codifica para una peroxidasa en *A. mexicanum* (Del Moral-Morales et al. 2024), cuyo homólogo en otras especies participa en la reducción de H_2O_2 (104), su menor expresión en el blastema de 10 y 20 dpa es consistente con estudios previos que han reportado un incremento en los niveles de ROS desde el blastema temprano hasta el blastema tardío durante la regeneración de extremidades en *A. mexicanum* (30,105,106). En conjunto, estos hallazgos sugieren que *Gpx7* podría estar relacionado con las ROS durante la regeneración del autopodio.

Por otro lado, los cambios en la expresión de *Fstl1* en el blastema de 10 y 20 dpa podría estar relacionada con la activación de la vía de señalización de BMP (bone morphogenetic protein), ya que el homólogo codificado por *Fstl1* evita la activación de esta vía de señalización (63). Considerando el papel de *Fstl1* como un regulador negativo de la vía de BMP, la disminución de la expresión de *Fstl1* en el blastema de 10 y 20 dpa observada en nuestro trabajo es consistente con reportes anteriores que indican que la señalización de BMP se encuentra activa desde el blastema temprano hasta la formación de los dígitos (48). Por otro lado, la expresión de *Cthrc1.1* no mostró cambios significativos en el blastema a los 10 y 20 dpa; sin embargo, esto no descarta su posible relevancia en la regeneración. Esta idea se respalda en la diferencia de expresión de *Cthrc1.1* entre organismos de 8 meses y 8 años. Por el contrario, su expresión podría experimentar cambios significativos en etapas distintas a las evaluadas en este trabajo.

8.2. Las diferencias en la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses versus 8 años de edad

El análisis de la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el autopodio de *A. mexicanum* de diferentes edades, reveló una disminución significativa en la expresión de estos genes en los organismos de 8 años, en contraste con una mayor expresión observada en los organismos de 8 meses. Este patrón podría sugerir que los organismos de mayor edad, presentan una deficiencia en la expresión basal de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el autopodio, lo que podría estar relacionado con la incapacidad para formar un blastema, y en última instancia con la pérdida de su capacidad regenerativa. Esta propuesta se fundamenta en la relación de los homólogos de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* con la ECM (98), las vías de señalización de BMP (77) y TGF- β (64), así como con los niveles de ROS, específicamente de H₂O₂ (104).

En estudios en los que *A. mexicanum* pierde la capacidad de regenerar extremidades debido a la inducción de la metamorfosis, se ha observado una desregulación en la expresión de elementos de la ECM (36). Esta desregulación incluye sobreexpresión de genes codificantes para queratinas (*Krt6a*) y la subexpresión de genes codificantes para metaloproteasas de la ECM (*Mmp9*). Dado que *Adamts17.1* codifica para una metaloproteasa de la ECM (3) y su homólogo en mamíferos está relacionado con la secreción de proteínas clave, como la fibrilina I, fibronectina y colágena I hacia la ECM, (98), la disminución de la expresión de este gen en el autopodio en organismos de 8 años podría estar asociada con una alteración similar. Esto coincide con los patrones de desregulación en la ECM descritos en *A. mexicanum* metamórficos (3), sugiriendo un vínculo entre la expresión de *Adamts17.1* y la capacidad regenerativa en esta especie.

Por otro lado, la deficiencia en la expresión *Gpx7* observada en los organismos de 8 años podría tener un impacto negativo en la regeneración del autopodio. El homólogo de *Gpx7* en mamíferos está implicado en la regulación de los niveles de H₂O₂ (104), y se ha reportado que la alteración de esta especie reactiva de oxígeno durante la regeneración extremidades y del apéndice caudal impide la formación del blastema en *A. mexicanum* (30,105). Adicionalmente, los homólogos de *Fstl1* y *Cthrc1.1* están asociados con las vías de señalización BMP y TGF- β , respectivamente, las cuales son fundamentales para la regeneración de extremidades, específicamente al alterar el proceso de esqueletogénesis en *A. mexicanum* (48,70,74). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la reducción en la expresión de *Fstl1* y *Cthrc1.1* en organismos de mayor edad podría contribuir a la pérdida de capacidad regenerativa al desregular vías clave para la formación de estructuras óseas.

8.3. Los elementos de regulación transcripcional en el promotor tentativo de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*

A partir de los cambios en la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* durante el proceso de regeneración del autopodio, surgen interrogantes sobre los mecanismos subyacentes que podrían estar involucrados en la regulación transcripcional de estos genes. Por ejemplo, la región cercana al TSS de *Cthrc1.1* no presentó una isla CpG y

enriquecimiento de H3K4me3, por lo que, no se puede decir con seguridad que su promotor tentativo es la región comprendida entre los 1000 pb río arriba y río abajo. Por el contrario es posible que estos elementos se encuentren en regiones más alejadas al TSS, donde se pueden localizar promotores distales (88). Por otro lado, nuestro grupo de trabajo observó previamente que la modificación postraducciona de histonas H3K4me3 podría regular los cambios en la expresión de *Adamts17.1*, pues el enriquecimiento de esta modificación postraducciona en el blastema de 10 incrementa en comparación con el blastema de 20 dpa (107). A partir de estos antecedentes, surge la interrogante sobre si H3K4me3 también podría estar relacionada con la regulación transcripcional de *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*, por lo que sería interesante analizar el enriquecimiento de H3K4me3 en estos genes en el blastema de 10 y 20 dpa.

En línea con lo anterior, en nuestro análisis de motivos de unión identificamos la presencia del motivo de PRDM9 en los promotores de *Adamts17.1*, *Fstl1* y *Gpx7*. PRDM9 es una metiltransferasa clave en el establecimiento de las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K36me3 (108). Aunque la presencia de este motivo no establece una relación directa con la ocupación del promotor, sugiere que estos genes podrían estar implicados en un mecanismo de regulación epigenética mediado por modificaciones postraduccionales de histonas. Este hallazgo cobra especial relevancia en el caso del promotor tentativo de *Adamts17.1*, en el cual se observa un cambio en el enriquecimiento de H3K4me3 en el blastema a los 10 y 20 dpa (107), lo que sugiere que las modificaciones de histonas podrían estar relacionadas con la regulación de la expresión de este gen durante el proceso de regeneración.

Asimismo, los motivos de unión para factores de transcripción (TF) en el promotor de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* están relacionados con procesos de desarrollo, como la formación de estructuras anatómicas y la morfogénesis embrionaria. Tal es el caso de los motivos de unión para los TF de la familia ZNF (ZNF93, ZNF460, ZNF460, ZNF530 y ZNF701); los TF de esta familia actúan como represores transcripcionales de elementos transponibles (90) y regulan la expresión de genes de totipotencialidad (como *Oct4* y *Pax3*) durante el desarrollo (109). En el promotor del gen *Adamts17.1* también se encontró el motivo de unión para CTCF y TBX3; TBX3 es indispensable para la formación de las estructuras distales de las extremidades en modelos murinos en desarrollo (92), mientras que CTCF tiene funciones epigenéticas relacionadas con la estructura tridimensional de la cromatina y con el proceso de desarrollo (96). La presencia del motivo de unión de CTCF resalta, ya que es otro factor epigenético identificado en este análisis que no ha sido evaluado en el proceso de regeneración tisular de *A. mexicanum*.

El promotor del gen *Gpx7* presenta motivos de unión para TF de la familia HOX, los cuales están involucrados en el desarrollo de las extremidades de mamíferos (110) y anfibios, incluyendo *A. mexicanum* (91). En *Gpx7* se encontraron los motivos para los TF HOXB9 y HOXC9, los cuales están involucrados en el establecimiento de la identidad anterior y posterior de las extremidades en las aves (89), pero que no han sido estudiados en el proceso de regeneración de extremidades de *A. mexicanum*. Por otro lado, en el promotor de *Cthrc1.1* se identificaron motivos de unión para TF de la familia POU, los cuales están conservados en distintas especies, incluyendo al pez cebra y ranas (93). POU2F llama la atención, pues se ha identificado a su gen homólogo en *A. mexicanum*, el cual se nombró como *AxoPou2*. Se ha propuesto que *AxoPou2* podría participar en el desarrollo de *A.*

mexicanum, ya que se expresa en las capas germinales y podría ser un candidato relevante para el mantenimiento del potencial pluripotente de células troncales (94).

9. Conclusiones

1. La diferencia en la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* entre individuos de *A. mexicanum* de 8 meses y 8 años de edad, sugiere que estos genes podrían desempeñar un papel clave en la regeneración del autopodio.
2. El comportamiento transcripcional de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* en el blastema a los 10 y 20 dpa coincide con las etapas en las que ocurren procesos celulares relacionados con la ECM, la respuesta al estrés oxidativo y la morfogénesis.
3. La caracterización *in silico* sugiere que el comportamiento transcripcional de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* podría ser regulado por factores transcripcionales asociados a procesos biológicos clave, como el desarrollo y mecanismos epigenéticos.
4. Los hallazgos de este trabajo constituyen un punto de partida para una evaluación detallada de los elementos de regulación transcripcional de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*, así como de su papel en el proceso de regeneración del autopodio de *A. mexicanum*.

10. Limitaciones del estudio

1. A partir de la evaluación transcripcional de *Adamts17.1*, *Fstl1* y *Gpx7*, se propuso que estos genes podrían ser relevantes para la regeneración del autopodio. No obstante, aún se requiere evidencia experimental para confirmar esta hipótesis. En este sentido, estudios futuros sobre la manipulación de la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1* y *Gpx7* *in vivo* o *in vitro* durante el proceso de regeneración permitirían validar su papel.
2. La expresión de *Cthrc1.1* no mostró cambios significativos en el blastema a los 10 y 20 dpa; sin embargo, esto no descarta su posible relevancia en la regeneración. Esta idea se respalda en la diferencia de expresión de *Cthrc1.1* entre organismos de 8 meses y 8 años. Es posible que, para detectar cambios en su expresión, sea necesario evaluarla en función del tiempo a lo largo del proceso de regeneración, por ejemplo, en blastemas formados antes de los 10 dpa, después de los 20 dpa o en un punto intermedio entre ambos días.
3. La identificación de la región promotora tentativa de *Cthrc1.1* es compleja debido a la información limitada sobre los elementos de regulación transcripcional en el genoma de *A. mexicanum*. Solo algunos estudios han evaluado elementos comúnmente asociados a promotores, como la modificaciones postraduccionales de H3K4me3. Sin embargo, *Cthrc1.1* no presentó enriquecimiento de esta marca postraduccional ni la presencia de islas CpG en la región cercana al TSS. Aun así, es posible que estos elementos se encuentren en regiones más distales, donde podrían localizarse promotores relacionados con la regulación de *Cthrc1.1*.
4. En este trabajo también se encontró evidencia de factores transcripcionales que podrían estar involucrados en la regulación de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*. Sin embargo, dado que estos resultados provienen de un análisis *in silico*, es necesario validar la región promotora de cada gen y la unión de las proteínas a estas secuencias.

11. Perspectivas

Dado que se observaron cambios en la expresión de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* durante la regeneración del autopodio de *A. mexicanum* de 8 meses de edad, estudios posteriores podrían ser valiosos para evaluar si la abundancia de las proteínas ADAMTS17, FSTL1, GPX7 y CTHRC1 corresponde con los niveles de los transcritos en el blastema de 10 y 20 dpa. Este análisis podría realizarse mediante métodos de inmunodetección como Western blot e inmunohistoquímica con anticuerpos específicos.

Por otro lado, si bien la evaluación transcripcional de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* permitió caracterizar los cambios en su expresión durante la regeneración del autopodio, su efecto biológico no fue evaluado. Determinar este efecto podría ser clave para dilucidar el papel de estos genes en dicho proceso. Como una primera aproximación, sería valioso realizar experimentos en los que se inhiba la expresión de *Adamts17.1* y se sobreexpresen *Gpx7*, *Fstl1* y *Cthrc1.1*, con el fin de evaluar su impacto en procesos celulares fundamentales para la regeneración, como la migración celular y la regulación de los niveles de H₂O₂. Para esto sería valioso la creación de una línea celular primaria de fibroblastos del autopodio de *A. mexicanum*.

12. Anexos

12.1. Método en extenso para la extracción de ARN de muestras de tejido de autopodio y de blastema

1. Retirar el tejido del RNAlater y pesar.

Nota:

- Para la extremidad de 0.10 g a 0.20 g de tejido son suficientes. Para el blastema usa todo el tejido.
- Procurar que el tejido no tenga exceso de RNAlater o en la precipitación se formarán “burbujas” que disminuyen la calidad del ARN. El exceso se puede eliminar al colocar el tejido sobre una superficie (caja de petri) y con una micropipeta se succiona el RNAlater.
- Todo el procedimiento debe realizarse en frío.

2. Cortar el tejido en pedazos muy pequeños.

3. Agregar 500 μ L de Trizol al tejido de extremidad o blastema.

Nota: Usar 500 μ L de trizol para 0.10 g a 0.20 g de tejido extremidad y para el blastema.

4. Homogeneizar con el pistilo hasta que no se observen fragmentos de tejido demasiado grandes.

Nota: el método que tiene mejor rendimiento es este: cortar y después homogeneizar con el pistilo en el Trizol. **No se recomienda usar otro método para la extracción de RNA.**

5. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada mL de trizol usado. 100 μ L

6. Mezclar con el vortex hasta que la solución se espese y tenga un color rosa claro.

7. Centrifugar a 12 000 rpm por 15 min a 4°C

b) Precipitación de RNA

8. Añadir 0.5 mL de isopropanol frío por cada mL de Trizol usado. 250 μ L.

Nota: En este punto se puede parar e incubar a -20°C toda una noche o continuar.

9. Agitar por inversión 10 veces.

10. Centrifugar a 12 000 rpm por 15 min a 4°C.

11. Descartar sobrenadante y recuperar el pellet sin perturbarlo. Quitar la mayor cantidad de líquido posible.

c) Lavados

12. Resuspender el pellet en 1 mL de etanol al 75% por mL de trizol usado. 500 μ L.

13. Mezclar en el vortex por un minuto.

14. Centrifugar a 12 000 rpm por 10 min.

Nota: Aquí se puede parar hasta por un año.

15. Quitar la mayor cantidad de sobrenadante sin perturbar la pastilla.

16. Dejar secar el pellet abriendo la tapa del tubo a temperatura ambiente.

d) Resuspensión del RNA

17. Resuspender el pellet en 10 μ L de agua libre de RNasa y cuantificar en Nanodrop.

Nota: Para el blastema no se recomienda resuspender en un volumen mayor. porque la concentración obtenida es baja y un volumen mayor la diluye aún más. En el caso de la extremidad, puedes iniciar resuspendiendo en 10 μ L e incrementar dependiendo de la concentración.

18. Evaluar la calidad mediante geles de agarosa y alicuotar.

19. Almacenar a -80 °C.

12.2. Método en extenso para los ensayos de *Western blot*

1. Separar los extractos de proteínas totales mediante electroforesis SDS-PAGE en un gel de acrilamida-bis acrilamida al 10%.
 - Correr el gel a 60 V hasta que las proteínas pasen el gel separador, posteriormente el voltaje se incrementa a 120 V hasta que los extractos están aproximadamente a un cm del final del gel.
2. Continuar con la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF mediante transferencia semi-seca.

- Equilibrar el gel por 15 min en buffer de transferencia.

- Cortar la membrana usando como referencia una tarjeta y activarla colocándola en metanol al 100% por un min, posteriormente enjuagar con buffer de transferencia

Nota: La membrana no debe secarse una vez que se activa.

- Montar el sistema de transferencia con el siguiente orden:

1. Filtro, si son gruesos solo uno o si son delgados dos o tres.
2. Membrana activada.
3. Gel.

Nota: Es buena idea hacer un corte en una esquina del gel y de la membrana para no perder el orden de las muestras. El corte tiene que estar en el mismo lado del gel y de la membrana.

4. Filtro, si son gruesos usa 2 o si son delgados usa más.

5. Elimina todas las burbujas con un rodillo o con una pipeta de plástico.

6. Cierra la cámara de transferencia.

- Realiza la transferencia por 45 minutos a 20 V.

Nota: Cuando termine la transferencia, si tienes un marcador para *Western blot* marca las bandas del marcador de peso molecular en la membrana. Después eso ayuda en el revelado

3.

4. Teñir la membrana con rojo Ponceau y el gel de SDS-PAGE con azul de metileno por cinco min con agitación, para comprobar que las proteínas se hayan transferido del gel a la membrana.

Nota:

- ★ El rojo de Ponceau se puede preparar y guardar para ensayos posteriores, sin embargo, a veces puedes ver bandas y otras no. Es mejor preparar una solución nueva o usar una no tan vieja.

- ★ Si las bandas no se ven muchos recomiendan no continuar con el ensayo, sin embargo, yo he obtenido resultados aún cuando la tinción con Rojo de Ponceau no mostró bandas.

5. Si realizas el paso 3, si no pasar al paso 5. Lava la membrana con agua destilada varias veces hasta que el color rojo se quite. Si queda un poco teñida no importa.

6. Bloquear la membrana con leche en polvo libre de grasa al 6% por una hora a temperatura ambiente con agitación.

Nota: el bloqueo también se puede realizar con albúmina al 5%. Sin embargo, para los ensayos de ADAMTS17 el resultado fue el mismo que con leche en polvo.

7. Realizar las diluciones del anticuerpo primario con TBST (TBS 1x con Tween 0.05%) y leche al 0.025%.

Nota: durante las estandarizaciones del anticuerpo se recomienda probar diferentes diluciones. Para el anticuerpo anti-ADAMTS17 (Q12 Santa Cruz Biotechnology, No. catálogo: sc-100480) se probaron diluciones de 1:200 hasta 1:2000. Con diluciones mayores a 1:1000, no se observa señal. La mejor dilución es 1:750.

8. Incubar la membrana con el anticuerpo primario por una noche a 4°C.

Nota: si la incubación se realiza a temperatura ambiente, la unión al epítipo se favorece pero el tiempo de incubación disminuye, generalmente a una hora.

9. Lavar el anticuerpo primario cinco veces con TBST por cinco minutos a temperatura ambiente y con agitación.

10. Realizar la incubación de la membrana con una dilución del anticuerpo secundario en TBST con leche al 0.025% por una hora a temperatura ambiente con agitación.

11. Lavar el anticuerpo secundario seis veces con TBST por cinco minutos a temperatura ambiente y con agitación.

Nota:

- ★ Si el revelado no se realiza inmediatamente, la membrana se puede guardar a 4°C en TBS SIN detergente.

12. Revelar la membrana.

→ Si el revelado se realiza con placas, es importante probar varios tiempos de exposición al luminol.

→ Transfiere la placa al revelador y agita suavemente.

Nota: una vez que aparece la primera banda cuando la placa está en el revelador ten cuidado de no quemarla. Corta la reacción con agua.

→ Enjuagar la placa con agua.

→ Colocar la placa en el fijador.

→ Enjuagar la placa con agua.

→ Secar la placa.

Este método se validó mediante la evaluación de la proteína β -actina en la línea celular U87. Los resultados mostraron una banda con una masa molecular correspondiente a la de β -actina (Figura 15).

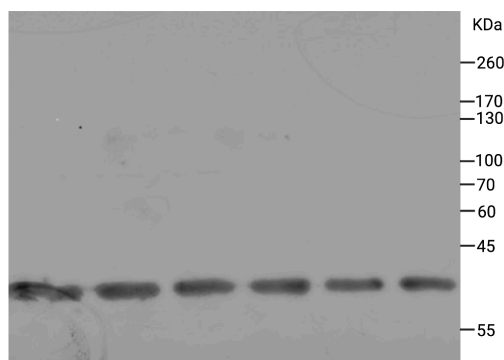


Figura 15. Western blot para β -actina en extractos de proteínas totales de la línea celular U87. Se emplearon 60 μ g proteínas totales con una dilución 1:2000 del anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology, No. catálogo: sc-47778). Se observa una banda de aproximadamente 42 KDa.

12.3. Localización de los oligonucleótidos sintéticos de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, *Cthrc1.1*

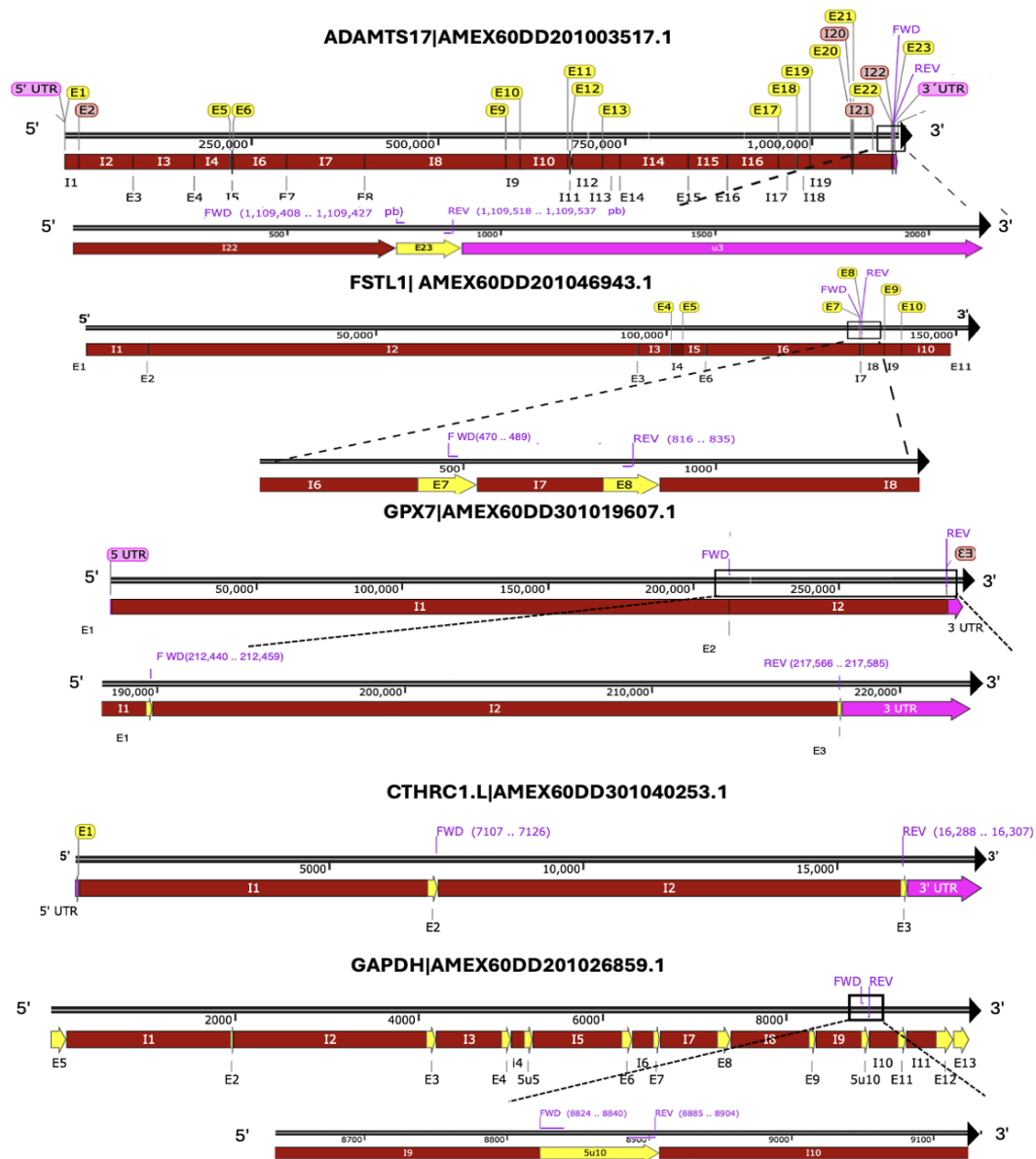


Figura 16. Localización de los oligonucleótidos sintéticos empleados para la evaluación transcripcional de *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7*, *Cthrc1.1* y *Gapdh* mediante qPCR. Se muestran todos los exones (E) e intrones (I) presentes en cada gen y la región que es complementaria con el primer antisentido (REV) o sentido (FWD).

12.4. Localización del enriquecimiento de la modificación postraduccional H3K4me3 y de la isla CpG en el promotor de los genes *Gapdh*, *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1* de *A. mexicanum*.

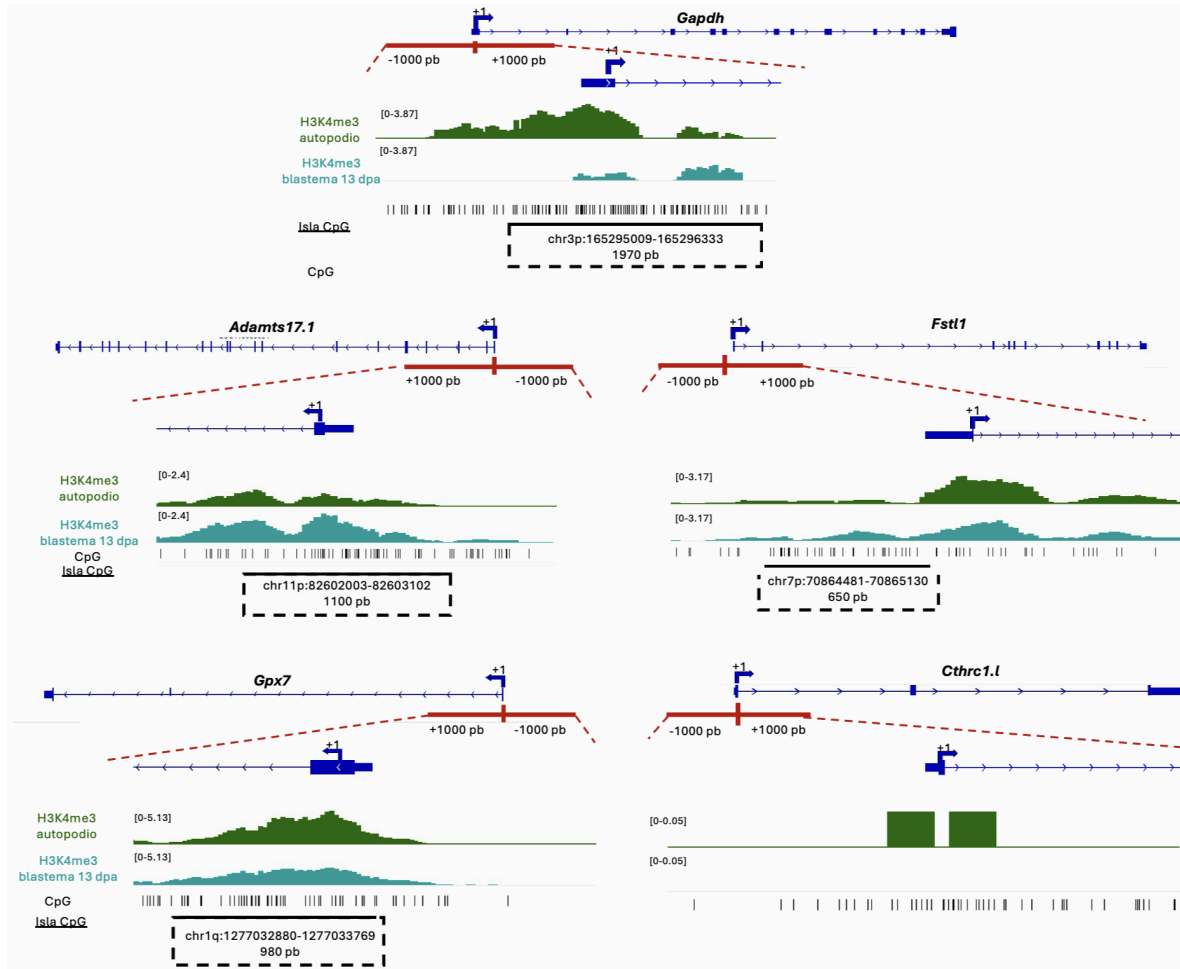


Figura 17. Enriquecimiento de la modificación postraduccional H3K4me3 e islas CpG en el promotor de los genes *Adamts17.1*, *Fstl1*, *Gpx7* y *Cthrc1.1*. Se muestra la región comprendida entre los 1000 pb río arriba y río abajo del TSS de cada gen, donde se localizan los dinucleótidos CpG (rectángulos en color negro) y la isla CpG (línea horizontal en color negro) que co-localiza con la H3K4me3. En los rectángulos en color negro con bordes punteados, se indica la localización de la isla CpG y su longitud.

12. Bibliografía

1. Joven A, Elewa A, Simon A. Model systems for regeneration: salamanders. *Development* . 2019 Jul 22;146(14).
2. Polikarpova A, Ellinghaus A, Schmidt-Bleek O, Grosser L, Bucher CH, Duda GN, et al. The specialist in regeneration-the Axolotl-a suitable model to study bone healing? *NPJ Regen Med*. 2022 Jun 30;7(1):35.
3. Del Moral-Morales A, Sámano C, Ocampo-Cervantes JA, Topf M, Baumbach J, Hernández J, et al. Key proteins for regeneration in *A. mexicanum*: Transcriptomic insights from aged and juvenile limbs. *Scientifica (Cairo)*. 2024 Jan 1;2024(1):5460694.
4. Voss SR, Palumbo A, Nagarajan R, Gardiner DM, Muneoka K, Stromberg AJ, et al. Gene expression during the first 28 days of axolotl limb regeneration I: Experimental design and global analysis of gene expression. *Regeneration (Oxf)*. 2015 Jun;2(3):120–36.
5. Gerber T, Murawala P, Knapp D, Masselink W, Schuez M, Hermann S, et al. Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. *Science* . 2018 Sep 27;362(6413).
6. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314–21.
7. Reddien PW. The Cellular and Molecular Basis for Planarian Regeneration. *Cell*. 2018 Oct 4;175(2):327–45.
8. Bryant DM, Sousounis K, Payzin-Dogru D, Bryant S, Sandoval AGW, Martinez Fernandez J, et al. Identification of regenerative roadblocks via repeat deployment of limb regeneration in axolotls. *NPJ Regen Med*. 2017 Nov 6;2:30.
9. Mehrabi A, Golriz M, Khajeh E, Ghamarnejad O, Probst P, Fonouni H, et al. Meta-analysis of the prognostic role of perioperative platelet count in posthepatectomy liver failure and mortality. *Br J Surg*. 2018 Sep;105(10):1254–61.
10. Storer MA, Miller FD. Cellular and molecular mechanisms that regulate mammalian digit tip regeneration. *Open Biol*. 2020 Sep;10(9):200194.
11. Jacques E, Suuronen EJ. The Progression of Regenerative Medicine and its Impact on Therapy Translation. *Clin Transl Sci*. 2020 May;13(3):440–50.
12. Ivankovic M, Haneckova R, Thommen A, Grohme MA, Vila-Farré M, Werner S, et al. Model systems for regeneration: planarians. *Development* . 2019 Sep 11;146(17).
13. Vogg MC, Galliot B, Tsiairis CD. Model systems for regeneration: Hydra. *Development* . 2019 Nov 1;146(21). 14. Marques IJ, Lupi E, Mercader N.

Model systems for regeneration: zebrafish. *Development* . 2019 Sep 20;146(18).

15. Phipps LS, Marshall L, Dorey K, Amaya E. Model systems for regeneration: *Xenopus*. *Development* . 2020 Mar 19;147(6).
16. Tajer B, Savage AM, Whited JL. The salamander blastema within the broader context of metazoan regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2023 Aug 11;11:1206157.
17. Kawaguchi A, Wang J, Knapp D, Murawala P, Nowoshilow S, Masselink W, et al. A chromatin code for limb segment identity in axolotl limb regeneration. *Dev Cell*. 2024 Aug 19;59(16):2239–53.e9.
18. Nowoshilow S, Schloissnig S, Fei JF, Dahl A, Pang AWC, Pippel M, et al. The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*. 2018 Feb 1;554(7690):50–5.
19. Leigh ND, Dunlap GS, Johnson K, Mariano R, Oshiro R, Wong AY, et al. Transcriptomic landscape of the blastema niche in regenerating adult axolotl limbs at single-cell resolution. *Nat Commun*. 2018 Dec 4;9(1):5153.
20. Currie JD, Kawaguchi A, Traspas RM, Schuez M, Chara O, Tanaka EM. Live Imaging of Axolotl Digit Regeneration Reveals Spatiotemporal Choreography of Diverse Connective Tissue Progenitor Pools. *Dev Cell*. 2016 Nov 21;39(4):411–23.
21. Zug GR,) LV (J, Caldwell JP. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press; 2001. 630 p.
22. Farkas JE, Monaghan JR. Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. *Methods Mol Biol*. 2015;1290:27–46.
23. Mena González H. Manual básico para el cuidado en cautiverio del axolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
24. Reiß C. Cut and Paste: The Mexican Axolotl, Experimental Practices and the Long History of Regeneration Research in Amphibians, 1864-Present. *Front Cell Dev Biol*. 2022 May 5;10:786533.
25. Woodcock MR, Vaughn-Wolfe J, Elias A, Kump DK, Kendall KD, Timoshevskaya N, et al. Identification of Mutant Genes and Introgressed Tiger Salamander DNA in the Laboratory Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Sci Rep*. 2017 Jan 31;7(1):6.
26. Humphrey RR. Albino axolotls from an albino tiger salamander through hybridization. *J Hered*. 1967 May-Jun;58(3):95–101.
27. Welcome to AGSC . [citado 2025 Mar 17]. Available from: <https://ambystoma.uky.edu/genetic-stock-center/>

28. Torres-Sánchez M. Variation under domestication in animal models: the case of the Mexican axolotl. *BMC Genomics*. 2020 Nov 23;21(1):827.
29. José Antonio Ocampo Cervantes el SIA UX. Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca CIBAC . [citado 2025 Mar 17]. Available from: <https://enlacesx.xoc.uam.mx/article/centro-de-investigaciones-biologicas-y-acuicolas-de-cuernavaca-cibac/>
30. Carbonell-M B, Zapata Cardona J, Delgado JP. Post-amputation reactive oxygen species production is necessary for axolotls limb regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Aug 26;10:921520.
31. Frost SK, Briggs F, Malacinski GM. A color atlas of pigment genes in the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Differentiation*. 1984 Jun 1;26(1):182–8.
32. Monaghan JR, Stier AC, Michonneau F, Smith MD, Pasch B, Maden M, et al. Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration (Oxf)*. 2014 Feb;1(1):2–14.
33. Johnson CK, Voss SR. Salamander paedomorphosis: linking thyroid hormone to life history and life cycle evolution. *Curr Top Dev Biol*. 2013 Jan 1;103:229–58.
34. Crowner A, Khatri S, Blichmann D, Voss SR. Rediscovering the Axolotl as a Model for Thyroid Hormone Dependent Development. *Front Endocrinol* . 2019 Apr 12;10:237.
35. Khattak S, Murawala P, Andreas H, Kappert V, Schuez M, Sandoval-Guzmán T, et al. Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination. *Nat Protoc*. 2014 Mar;9(3):529–40.
36. Ye F, Zhang G, E W, Chen H, Yu C, Yang L, et al. Construction of the axolotl cell landscape using combinatorial hybridization sequencing at single-cell resolution. *Nat Commun*. 2022 Jul 22;13(1):4228.
37. Stocum DL. Mechanisms of urodele limb regeneration. *Regeneration (Oxf)*. 2017 Aug;4(4):159–200.
38. Bassat E, Tanaka EM. The cellular and signaling dynamics of salamander limb regeneration. *Curr Opin Cell Biol*. 2021 Dec;73:117–23.
39. Tanaka EM. The Molecular and Cellular Choreography of Appendage Regeneration. *Cell*. 2016 Jun 16;165(7):1598–608.
40. Aztekin C. Tissues and Cell Types of Appendage Regeneration: A Detailed Look at the Wound Epidermis and Its Specialized Forms. *Front Physiol*. 2021 Nov 23;12:771040.

41. Satoh A. Limb Regeneration: Reconstitution of Complex Organs Using Specific Tissue Interactions. In: Kondoh H, Kuroiwa A, editors. *New Principles in Developmental Processes*. Tokyo: Springer Japan; 2014. p. 197–210.
42. Wells KM, Kelley K, Baumel M, Vieira WA, McCusker CD. Neural control of growth and size in the axolotl limb regenerate. *Elife* . 2021 Nov 15;10.
43. Schartl M, Woltering JM, Irisarri I, Du K, Kneitz S, Pippel M, et al. The genomes of all lungfish inform on genome expansion and tetrapod evolution. *Nature*. 2024 Oct 14;634(8032):96–103.
44. Schloissnig S, Kawaguchi A, Nowoshilow S, Falcon F, Otsuki L, Tardivo P, et al. The giant axolotl genome uncovers the evolution, scaling, and transcriptional control of complex gene loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2021 Apr 13;118(15).
45. Mercader N, Tanaka EM, Torres M. Proximodistal identity during vertebrate limb regeneration is regulated by Meis homeodomain proteins. *Development*. 2005 Sep;132(18):4131–42.
46. Roensch K, Tazaki A, Chara O, Tanaka EM. Progressive specification rather than intercalation of segments during limb regeneration. *Science*. 2013 Dec 13;342(6164):1375–9.
47. Nacu E, Gromberg E, Oliveira CR, Drechsel D, Tanaka EM. FGF8 and SHH substitute for anterior–posterior tissue interactions to induce limb regeneration. *Nature*. 2016 Apr 27;533(7603):407–10.
48. Vincent E, Villiard E, Sader F, Dhakal S, Kwok BH, Roy S. BMP signaling is essential for sustaining proximo-distal progression in regenerating axolotl limbs. *Development* . 2020 Jul 31;147(14).
49. Guimond JC, Lévesque M, Michaud PL, Berdugo J, Finnson K, Philip A, et al. BMP-2 functions independently of SHH signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs. *BMC Dev Biol*. 2010 Feb 12;10:15.
50. Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 4;110(23):9415–20.
51. Huang T, Zuo L, Walczyńska KS, Zhu M, Liang Y. Essential roles of matrix metalloproteinases in axolotl digit regeneration. *Cell Tissue Res*. 2021 Jul;385(1):105–13.
52. Otsuki L, Tanaka EM. Positional Memory in Vertebrate Regeneration: A Century's Insights from the Salamander Limb. *Cold Spring Harb Perspect Biol* . 2022 Jun 14;14(6).
53. Lovely AM, Duerr TJ, Qiu Q, Galvan S, Voss SR, Monaghan JR. Wnt Signaling Coordinates the Expression of Limb Patterning Genes During Axolotl Forelimb

Development and Regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Apr 21;10:814250.

54. Stewart R, Rascón CA, Tian S, Nie J, Barry C, Chu LF, et al. Comparative RNA-seq analysis in the unsequenced axolotl: the oncogene burst highlights early gene expression in the blastema. *PLoS Comput Biol.* 2013 Mar 7;9(3):e1002936.
55. Yun MH. Changes in Regenerative Capacity through Lifespan. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 23;16(10):25392–432.
56. Yun MH. Salamander Insights Into Ageing and Rejuvenation. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jun 7;9:689062.
57. Reuter H, Perner B, Wahl F, Rohde L, Koch P, Groth M, et al. Aging Activates the Immune System and Alters the Regenerative Capacity in the Zebrafish Heart. *Cells* . 2022 Jan 20;11(3).
58. Tsissios G, Theodoroudis-Rapp G, Chen W, Sallese A, Smucker B, Ernst L, et al. Characterizing the lens regeneration process in *Pleurodeles waltl*. *Differentiation.* 2023 Mar 11;132:15–23.
59. Bryant DM, Sousounis K, Farkas JE, Bryant S, Thao N, Guzikowski AR, et al. Repeated removal of developing limb buds permanently reduces appendage size in the highly-regenerative axolotl. *Dev Biol.* 2017 Apr 1;424(1):1–9.
60. Faisal M, Mehreen A, Hays D, Yaseen F, Liang Y. The genetic odyssey of axolotl regeneration: Insights and innovations. *Int J Dev Biol.* 2024 Dec 12;68(3):103–16.
61. Bryant DM, Johnson K, DiTommaso T, Tickle T, Couger MB, Payzin-Dogru D, et al. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Rep.* 2017 Jan 17;18(3):762–76.
62. Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Oshima Y, Yano F, Mori Y, et al. Adamts17 is involved in skeletogenesis through modulation of BMP-Smad1/5/8 pathway. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Dec;76(23):4795–809.
63. Geng Y, Dong Y, Yu M, Zhang L, Yan X, Sun J, et al. Follistatin-like 1 (Fstl1) is a bone morphogenetic protein (BMP) 4 signaling antagonist in controlling mouse lung development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 26;108(17):7058–63.
64. Qin S, Zheng JH, Xia ZH, Qian J, Deng CL, Yang SL. CTHRC1 promotes wound repair by increasing M2 macrophages via regulating the TGF- β and notch pathways. *Biomed Pharmacother.* 2019 May;113:108594.
65. Ghatak S, Khanna S, Roy S, Thirunavukkarasu M, Pradeep SR, Wulff BC, et al. Driving adult tissue repair via re-engagement of a pathway required for fetal healing. *Mol Ther.* 2023 Feb 1;31(2):454–70.
66. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.*

2013 May;1830(5):3289–303.

67. Kim HJ, Lee Y, Fang S, Kim W, Kim HJ, Kim JW. GPx7 ameliorates non-alcoholic steatohepatitis by regulating oxidative stress. *BMB Rep.* 2020 Jun;53(6):317–22.
68. Al Haj Baddar NW, Chithrala A, Voss SR. Amputation-induced reactive oxygen species signaling is required for axolotl tail regeneration. *Dev Dyn.* 2019 Feb;248(2):189–96.
69. Duan X, Yuan X, Yao B, Song W, Li Z, Enhejirigala, et al. The role of CTHRC1 in promotion of cutaneous wound healing. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jun 15;7(1):183.
70. Qiu Q. Tgf- β , Wnt, and Fgf signaling pathways during axolotl tail regeneration and forelimb bud development. [tesis de doctorado]. Estados Unidos de América: University of Kentucky; 2019.
71. Lévesque M, Gatién S, Finnson K, Desmeules S, Villiard E, Pilote M, et al. Transforming growth factor: beta signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PLoS One.* 2007 Nov 28;2(11):e1227.
72. Pygay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L, et al. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ Res.* 2005 Feb 4;96(2):261–8.
73. LeClair RJ, Durmus T, Wang Q, Pygay P, Terzic A, Lindner V. Cthrc1 Is a Novel Inhibitor of Transforming Growth Factor- β Signaling and Neointimal Lesion Formation. *Circ Res.* 2007 Mar 30;100(6):826–33.
74. Denis JF, Sader F, Gatién S, Villiard É, Philip A, Roy S. Activation of Smad2 but not Smad3 is required to mediate TGF- β signaling during axolotl limb regeneration. *Development.* 2016 Oct 1;143(19):3481–90.
75. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Mar;44(3):480–8.
76. Shibamura M, Mashimo J, Mita A, Kuroki T, Nose K. Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur J Biochem.* 1993 Oct 1;217(1):13–9.
77. Sylva M, Li VSW, Buffing AAA, van Es JH, van den Born M, van der Velden S, et al. The BMP antagonist follistatin-like 1 is required for skeletal and lung organogenesis. *PLoS One.* 2011 Aug 3;6(8):e22616.
78. Morales J, Al-Sharif L, Khalil DS, Shinwari JMA, Bavi P, Al-Mahrouqi RA, et al. Homozygous mutations in ADAMTS10 and ADAMTS17 cause lenticular myopia,

ectopia lentis, glaucoma, spherophakia, and short stature. *Am J Hum Genet.* 2009 Nov;85(5):558–68.

79. Karoulias SZ, Beyens A, Balic Z, Symoens S, Vandersteen A, Rideout AL, et al. A novel ADAMTS17 variant that causes Weill-Marchesani syndrome 4 alters fibrillin-1 and collagen type I deposition in the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 2020 Jun;88:1–18.
80. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006 Jan 31;7(1):3.
81. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8.
82. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Aug;60(8):1647–58.
83. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):3740–5.
84. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987 Jul 20;196(2):261–82.
85. Vavouri T, Lehner B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. *Genome Biol.* 2012 Nov 27;13(11):R110.
86. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007 Apr;39(4):457–66.
87. Grant CE, Bailey TL, Noble WS. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics.* 2011 Apr 1;27(7):1017–8.
88. Sarda S, Das A, Vinson C, Hannenhalli S. Distal CpG islands can serve as alternative promoters to transcribe genes with silenced proximal promoters. *Genome Res.* 2017 Apr 1;27(4):553–66.
89. Moreau C, Caldarelli P, Rocancourt D, Roussel J, Denans N, Pourquie O, et al. Timed Collinear Activation of Hox Genes during Gastrulation Controls the Avian Forelimb Position. *Curr Biol.* 2019 Jan 7;29(1):35–50.e4.
90. Pontis J, Pulver C, Playfoot CJ, Planet E, Grun D, Offner S, et al. Primate-specific transposable elements shape transcriptional networks during human development. *Nat Commun.* 2022 Nov 23;13(1):7178.
91. Woltering JM, Holzem M, Meyer A. Lissamphibian limbs and the origins of tetrapod

- hox domains. *Dev Biol.* 2019 Dec 15;456(2):138–44.
92. Rallis C, Del Buono J, Logan MPO. Tbx3 can alter limb position along the rostrocaudal axis of the developing embryo. *Development.* 2005 Apr;132(8):1961–70.
 93. Malik V, Zimmer D, Jauch R. Diversity among POU transcription factors in chromatin recognition and cell fate reprogramming. *Cell Mol Life Sci.* 2018 May 15;75(9):1587–612.
 94. Tapia N, Reinhardt P, Duemmler A, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Esch D, et al. Reprogramming to pluripotency is an ancient trait of vertebrate Oct4 and Pou2 proteins. *Nat Commun.* 2012 Dec 11;3(1):1279.
 95. Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med.* 2017 Apr 28;49(4):e324.
 96. Herold M, Bartkuhn M, Renkawitz R. CTCF: insights into insulator function during development. *Development.* 2012 Mar;139(6):1045–57.
 97. Hubmacher D, Schneider M, Berardinelli SJ, Takeuchi H, Willard B, Reinhardt DP, et al. Unusual life cycle and impact on microfibril assembly of ADAMTS17, a secreted metalloprotease mutated in genetic eye disease. *Sci Rep.* 2017 Feb 8;7:41871.
 98. Balic Z, Misra S, Willard B, Reinhardt DP, Apte SS, Hubmacher D. Alternative splicing of the metalloprotease ADAMTS17 spacer regulates secretion and modulates autoprolytic activity. *FASEB J.* 2021 Feb;35(2):e21310.
 99. Suetsugu-Maki R, Maki N, Nakamura K, Sumanas S, Zhu J, Del Rio-Tsonis K, et al. Lens regeneration in axolotl: new evidence of developmental plasticity. *BMC Biol.* 2012 Dec 17;10:103.
 100. Yandulskaya AS, Miller MN, Ansari pour R, Carrier RL, Monaghan JR. Regenerating axolotl retinas regrow diverse cell types with modulation by Notch signaling and reconnect to the brain . *bioRxiv.* 2022. p. 2022.04.28.489898.
 101. Tank PW, Carlson BM, Connelly TG. A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J Morphol.* 1976 Sep;150(1):117–28.
 102. Lin TY, Gerber T, Taniguchi-Sugiura Y, Murawala P, Hermann S, Grosser L, et al. Fibroblast dedifferentiation as a determinant of successful regeneration. *Dev Cell.* 2021 May 17;56(10):1541–51.e6.
 103. McCusker CD, Gardiner DM. Positional information is reprogrammed in blastema cells of the regenerating limb of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *PLoS One.* 2013 Sep 27;8(9):e77064.
 104. Kanemura S, Sofia EF, Hirai N, Okumura M, Kadokura H, Inaba K. Characterization of the endoplasmic reticulum-resident peroxidases GPx7 and GPx8 shows the higher

- oxidative activity of GPx7 and its linkage to oxidative protein folding. *J Biol Chem*. 2020 Sep 4;295(36):12772–85.
105. Carbonell M B, Zapata Cardona J, Delgado JP. Hydrogen peroxide is necessary during tail regeneration in juvenile axolotl. *Dev Dyn*. 2022 Jun 1;251(6):1054–76.
106. Love NR, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y, et al. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol*. 2013 Feb 13;15(2):222–8.
107. Markoski MM, Garavaglia J, Oliveira A, Olivaes J, Marcadenti A. Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits. *Nutr Metab Insights*. 2016 Aug 2;9:51–7.
108. Altemose N, Noor N, Bitoun E, Tumian A, Imbeault M, Chapman JR, et al. A map of human PRDM9 binding provides evidence for novel behaviors of PRDM9 and other zinc-finger proteins in meiosis. *Elife* . 2017 Oct 26;6.
109. Fidalgo M, Huang X, Guallar D, Sanchez-Priego C, Valdes VJ, Saunders A, et al. Zfp281 Coordinates Opposing Functions of Tet1 and Tet2 in Pluripotent States. *Cell Stem Cell*. 2016 Sep 1;19(3):355–69.
110. Hubert KA, Wellik DM. Hox genes in development and beyond. *Development* . 2023 Jan 1;150(1).
105. Silva Díaz VG, Soto Reyes Solís E, del Moral Morales A. Caracterización epigenética de la región promotora del gen ADAMTS17 durante la regeneración tisular en *Ambystoma mexicanum*. [tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa; 2024.