

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Irapuato

**IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA FAMILIA miR-125 EN  
REGENERACIÓN DE EXTREMIDAD DE *AMBYSTOMA MEXICANUM***

Tesis que presenta

Adan Giovanni Gómez Landin

Pará obtener el Grado de  
Maestro en Ciencias

en la Especialidad de  
Biotecnología de plantas

Director de Tesis: Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez

Irapuato, Gto.

Febrero del 2016



## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Complejidad Molecular y del Desarrollo (LCMD), bajo la dirección del Dr. Alfredo Cruz, al cual agradezco sus críticas y puntos de vista, que permitieron tener una perspectiva más centrada sobre el objetivo de este trabajo. Deseo dar gracias a mi comité tutorial la Dra. Gertrud Lund y el Dr. Raúl Álvarez, por las críticas y aporte de ideas al presente trabajo. Así mismo a mis compañeros del laboratorio 2 (LCMD), en particular al Dr. Luis Fernando García Ortega por su apoyo en la parte bioinformática, aclarando dudas técnicas y aportes al presente trabajo. Al Ing. Francisco Falcón, por las discusiones y puntos de vista sobre miRNAs, los cuales fueron de gran ayuda. Deseo dar un especial agradecimiento al M. en C. Miguel Ángel García Olivares, por su ayuda en las cuestiones técnicas y aportes al trabajo.

Agradezco a mis compañeros y a las personas que he conocido a lo largo de estos dos años, por hacer de experiencia algo muy agradable. Por compartir en este periodo de tiempo su amistad y conocimiento.

Deseo agradecer muy especialmente a mi familia, mi hermano y hermana, quienes me han apoyado durante este viaje hacia las metas que me he propuesto. A la IBT. Anaís Liliana Mendoza Alatorre, por apoyarme en todo momento y darme ánimos cuando lo ameritaba. A la IQ. Rosa María Rangel, por sus consejos y su apoyo, con los cuales he logrado esta meta.

Por último, deseo agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante estos dos años, sin la cual no hubiera sido posible realizar este posgrado. Así como al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), por la oportunidad de realizar este posgrado.



# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
I.- ANTECEDENTES .....	3
1.1.- <i>Ambystoma mexicanum</i> .....	3
1.2.- Regeneración.....	4
1.3.- Regeneración de extremidad.....	6
1.4.- miRNAs durante la regeneración.....	9
1.5.- Familia miR-125 .....	13
II.- HIPOTESIS .....	16
III.- OBJETIVOS .....	17
3.1.- Objetivos específicos .....	17
3.1.1.- Análisis <i>in silico</i> de los miembros de la familia miR-125 (primarios y maduros) en transcriptomas de smRNAs y ncRNAs de <i>A. mexicanum</i> .....	17
3.1.2.- Análisis <i>in silico</i> del perfil de expresión de la familia miR-125 (primarios y maduros) en transcriptoma de smRNAs y ncRNAs <i>A. mexicanum</i> .....	17
3.1.3.- Predicción <i>in silico</i> de los blancos putativos de la familia miR-125 en transcriptoma de cRNAs de <i>A. mexicanum</i> .....	17
3.1.4.- Análisis del perfil de expresión de la familia miR-125 durante regeneración de extremidad de <i>A. mexicanum</i> . .....	17
IV.- METODOLOGIA .....	18
4.1.- IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LA FAMILIA miR-125 EN <i>A. mexicanum</i> .....	18
4.1.1.- Preparación de las librerías de RNAs-pequeños .....	18
4.1.2.- Preparación de las librerías de mRNAs .....	18
4.1.3.- Identificación de los miembros de la familia miR-125 (maduro).....	19
4.1.4.- Identificación de las secuencias primarias de los miembros de la familia miR-125 (pri-miR-125).....	19
4.1.5.- Predicción de precursores de miR-125 (pre-miR-125).....	19
4.2.- ANALISIS <i>IN SILICO</i> DEL PERFIL DE EXPRESION DE miR-125 EN <i>A. mexicanum</i> . .....	19
4.2.1.- Análisis de expresión de miR-125a y miR-125b por tejido. ....	19
4.2.2.- Análisis de expresión de pri-miR-125a pri-miR-125b por tejido y durante regeneración de extremidad.....	19
4.3.- PREDICCIÓN DE BLANCOS PUTATIVOS DE miR-125 EN <i>A. mexicanum</i> .....	20
4.3.1.- Predicción de blancos putativos.....	20
4.3.2.- Análisis de ontología.....	20

4.4.- ANALISIS DEL PERFIL DE EXPRESION DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA miR-125	20
4.4.1.- Amputación de extremidad anterior y extracción de RNA	20
4.4.2.- qRT-PCR	21
V.-RESULTADOS	23
5.1.- Procesamiento y anotación de librerías	23
5.1.1.- RNAs pequeños (smRNAs)	23
5.1.2.- RNAs mensajeros (mRNAs)	24
5.2.- Identificación <i>in silico</i> de la familia miR-125	25
5.2.1.- Identificación de precursores de miR-125	26
5.3.- Análisis <i>in silico</i> del patrón de expresión de la familia miR-125 (maduro y primarios)	27
5.3.1.- Expresión de miR-125a/b y pri-miR-125a/b (CPM) en los distintos tejidos de <i>A. mexicanum</i>	27
5.3.2.- Expresión durante regeneración (fold-change)	28
5.4.- Predicción <i>in silico</i> de blancos putativos de miR-125a/b de <i>A. mexicanum</i>	29
5.5.- Análisis de ontología (GO) de los blancos putativos de miR-125 de <i>A. mexicanum</i>	31
5.6.- Perfil de expresión de miR-125 durante regeneración de extremidad posterior de <i>A. mexicanum</i>	36
VI.-DISCUSIÓN	38
VII.- CONCLUSIONES	44
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	45
Anexo A	48
Anexo B	50
Anexo C	51
Anexo D	54
Anexo E	55
Anexo F	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Clasificación taxonómica de <i>A. mexicanum</i> _____	3
<b>Tabla 2.-</b> Organismos designados por tiempo de regeneración. _____	21
<b>Tabla 3.-</b> Lista de primers utilizados para qPCR. _____	21
<b>Tabla 4.-</b> Datos obtenidos de las librerías de <i>A. mexicanum</i> (smRNA) _____	23
<b>Tabla 5.-</b> miRNAs 100% conservados por tejido en <i>A. mexicanum</i> _____	24
<b>Tabla 6.-</b> Datos obtenidos de las librerías de <i>A. mexicanum</i> (mRNA-seq) _____	25
<b>Tabla 7.-</b> Porcentaje de anotación de transcriptoma de tejidos _____	25
<b>Tabla 8.-</b> Porcentaje de anotación de transcriptoma de tiempos de regeneración _____	25
<b>Tabla 9.-</b> pri-miR-125 putativos _____	25
<b>Tabla 10.-</b> Enriquecimiento de blancos putativos por tejido de <i>A. mexicanum</i> _____	31

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Figura 1.-</b> Morfología de <i>A. mexicanum</i> _____	4
<b>Figura 2.-</b> Regeneración en distintos niveles de organización biológica _____	5
<b>Figura 3.-</b> Mecanismos de regeneración _____	6
<b>Figura 4.-</b> Patrón esquelético y capacidad regenerativa de extremidad en tetrápodos _____	6
<b>Figura 5.-</b> Proceso de regeneración de extremidad en anfibios urodelos _____	7
<b>Figura 6.-</b> Regeneración de extremidad _____	9
<b>Figura 7.-</b> Biogénesis y características principales de los miRNAs _____	10
<b>Figura 8.</b> Estadíos de la regeneración de aleta caudal en <i>D. rerio</i> _____	11
<b>Figura 9.-</b> Regeneración de cola de <i>A. mexicanum</i> _____	12
<b>Figura 10.-</b> Expresión de miR-125 durante regeneración de medula espinal en <i>A. mexicanum</i> _____	13
<b>Figura 11.-</b> Alineamiento de la secuencia de miR-125a y miR-125b _____	14
<b>Figura 12.-</b> Cambios en los niveles de expresión de miR-125a/b y lin-28 _____	14
<b>Figura 13.-</b> Familia miR-125 en contexto celular y a nivel biológico _____	15
<b>Figura 14.-</b> Ciclos y temperaturas utilizadas para qPCR _____	21
<b>Figura 15.-</b> Distribución de secuencias por longitud en las librerías de smRNAs _____	23
<b>Figura 16.-</b> Distribución de secuencias por longitud en las librerías de smRNAs _____	24
<b>Figura 17.-</b> Secuencia correspondiente a miR-125a y miR-125b presentes en <i>A. mexicanum</i> _____	26
<b>Figura 18.-</b> Predicción de pre-miR-125a y pre-miR-125b en <i>A. mexicanum</i> _____	27
<b>Figura 19.-</b> Perfil de expresión de miR-125a y miR-125b en tejidos de <i>A. mexicanum</i> _____	28
<b>Figura 20.</b> Perfil de expresión de miR-125a, miR-125b-1 y miR-125b-2 en <i>A. mexicanum</i> _____	28
<b>Figura 21.-</b> Perfil de expresión de miR-125a/b al día 17 post-amputación _____	29
<b>Figura 22.-</b> Perfil de expresión de pri-miR-125a/b durante los distintos tiempos de regeneración _____	29
<b>Figura 23.-</b> Blancos predichos para miR-125a/b de <i>A. mexicanum</i> _____	30
<b>Figura 24.-</b> Agrupamiento de los tejidos en base a los blancos predichos _____	31
<b>Figura 25.-</b> Ontología de genes (GO) de los blancos de <i>A. mexicanum</i> _____	32
<b>Figura 26.-</b> Perfil de expresión de los genes blanco anotados dentro de las categorías GO nivel 3 _____	33
<b>Figura 27.-</b> Perfil de expresión de los genes blanco anotados dentro de las categorías GO nivel 3 _____	34
<b>Figura 28.-</b> Perfil de expresión de los genes blanco anotados dentro de las categorías GO nivel 3 _____	35
<b>Figura 29.-</b> Perfil de expresión de miR-125a y miR-125b de <i>A. mexicanum</i> durante regeneración _____	37
<b>Figura 30.-</b> Ubicación de miR-125b-1 y miR-125b-2 en el genoma de múltiples especies _____	38
<b>Figura 31.-</b> Predicción de unión de miR-125a y miR-125b a SEMA4D de <i>A. mexicanum</i> _____	39
<b>Figura 32.-</b> Diferencias de miR-125a y miR-125b de <i>A. mexicanum</i> _____	40
<b>Figura 33.-</b> Nivel de expresión de miR-125b durante regeneración de cola de <i>A. mexicanum</i> _____	41
<b>Figura 34.-</b> Posible regulación de miR-125a/b durante regeneración de extremidad _____	41
<b>Figura 35.-</b> Regulación de miR-125a y miR-125b durante el proceso de regeneración _____	42
<b>Figura 36.-</b> Potenciales genes blanco de miR-125 _____	43

## RESUMEN

*Ambystoma mexicanum* es un organismo endémico de México, posee la extraordinaria capacidad de regenerar varios segmentos de su cuerpo lo cual lo ha convertido en un prominente modelo de estudio en la regeneración de tejidos y extremidades en vertebrados. La regeneración de extremidades es un proceso complejo que involucra procesos celulares como son la des-diferenciación, proliferación y formación del blastema y un coordinado balance entre crecimiento y re-diferenciación, así como en la expresión de genes involucrados en el desarrollo embrionario. Por otra parte los miRNAs son pequeñas secuencias de RNA de aproximadamente 18-24 nucleótidos, los cuales actúan como finos moduladores de la expresión de genes fundamentales en distintos procesos del desarrollo embrionario. La familia de miR-125 es una familia de miRNAs altamente conservada entre múltiples especies que ha sido ampliamente relacionada con la regulación de proliferación y diferenciación celular, a través de la regulación de múltiples genes involucrados en dichos procesos. Por lo que la modulación de los niveles de expresión de la familia miR-125, define el estatus de la diferenciación celular en líneas celulares y tejidos específicos.

Mediante análisis *in silico* de librerías de RNAs no codificantes (ncRNAs) y RNAs pequeños (smRNAs) de *A. mexicanum* se logró identificar a dos secuencias correspondientes a miR-125 presentes en *A. mexicanum*, los cuales fueron llamados: miR-125a, codificado por un putativo loci el cual da origen a un transcrito primario (pri-miR-125a) y miR-125b, codificado por dos putativos loci los cuales dan origen a dos transcritos primarios (pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2). A partir de las secuencias primarias se realizó una predicción de las secuencias precursoras para ambos miRNAs (pre-miR-125a y pre-miR-125b). Describiendo por primera vez la presencia de miR-125a, así como los transcritos primarios para ambos miRNAs (miR-125a y miR-125b).

Una vez identificados miR-125a y miR-125b en *A. mexicanum*, se predijeron los blancos putativos en librerías RNAs codificantes (cRNAs) de *A. mexicanum*. Se realizó un análisis de ontología (GO) de los blancos predichos, identificando potenciales blancos involucrados en procesos biológicos y celulares relacionados con la de regeneración de extremidad. Mediante qPCR se observó el perfil de expresión de ambos miembros de la familia miR-125 de *A. mexicanum* durante la regeneración de extremidad, durante el cual ambos miRNAs (miR-125a and miR-125b) sufren una regulación negativa en los tiempos de regeneración analizados, mientras que algunos de los blancos predichos presentan una sobre-expresión, mostrando una correlación inversa del nivel de expresión de algunos blancos respecto a miR-125a y miR-125b durante la regeneración de extremidad; sugiriendo el posible rol de la familia miR-125 como un modulador del estado de diferenciación celular durante los distintos estadios de la regeneración de extremidad de *A. mexicanum*.

## ABSTRACT

*Ambystoma mexicanum*, an organism endemic to México, has the extraordinary capacity of regenerating many segments of its body. This capacity has made it a prominent model for the study of regeneration in vertebrate animals. Limb regeneration is a complex phenomenon that involves cellular processes such as de-differentiation, proliferation, blastema formation and a well-coordinated balance between development and re-differentiation which includes the expression of genes involved in embryonic development. miRNAs are a small RNAs around to 18-22 nucleotides, that act as fine-tune modulators of gene expression in some developmental process. miR-125 family is highly conserved among multiple species, your targets genes have involved in regulating the balance between cell proliferation and differentiation. Therefore, the levels of miR-125 regulation define the status of cell differentiation in specific cells and tissues.

By *in silico* analysis of non-coding RNAs (ncRNAs) and small RNAs (smRNAs) libraries of *A. mexicanum*, we identified two sequences that named: miR-125a, encode in a putatively single locus that generate a primary transcript (pri-miR-125a) and miR-125b, encode in a putatively two loci that generate two primary transcripts (pri-miR-125b-1 and pri-miR-125b-2). Through to primary sequences was predicted the precursor sequences: pre-miR-125a and pre-miR-125b. We found and report for first time the existence of miR-125a and the corresponding primary transcripts for miR-125a and miR-125b.

Identified miR-125 family in *A. mexicanum*, we predicted the putative targets from coding RNAs libraries (cRNAs) from *A. mexicanum*. We generated a gene ontology (GO) of the predicted targets, identified some target genes involved in limb regeneration. By qPCR we determined the expression profile of both miR-125 expression profiles during *A. mexicanum* limb regeneration. Both miRNAs (miR-125a and miR-125b) suffer a negative regulation while some predicted targets are upregulated during the same times of limb regeneration. The contrasting expression profile of miR-125a and miR-125b and its targets during limb regeneration, suggests at role of miR-125 family as a modulator of the cell differentiation status during stages in limb regeneration in *A. mexicanum*.

## I.- ANTECEDENTES

### 1.1.- *Ambystoma mexicanum*

*Ambystoma mexicanum* también conocido como ajolote o axolotl, es un anfibio del grupo de los urodelos que pertenece a la familia Ambystomatidae (Tabla 1). Esta familia está representada por 32 especies, de las cuales 16 se han registrado como endémicas en México. La mayoría de los ejemplares son organismos neoténicos, un carácter que hace referencia a la retención de las características larvarias en organismos adultos. Presentan una longitud hocico-cola de 30 cm aproximadamente en etapa adulta, poseen piel de color oscuro (entre negro y café) en la parte media de la región lateral y en la cola mientras que la parte media de la región lateral inferior, el vientre y la región gular son de color amarillo pardo con puntos oscuros y algunas veces presentando manchas claras. Poseen 4 extremidades de las cuales las dos extremidades anteriores terminan en 4 dedos y las 2 extremidades posteriores terminan en 5 dedos. Tienen una aleta dorsal que termina formando parte de la cola, la cual le permite locomoción bajo el agua. En la parte lateral-superior de la cabeza tiene 3 pares de branquias plumosas las cuales le proporcionan respiración acuática. A su vez posee un par de orificios nasales en la parte superior de su hocico, ya que su respiración ocasionalmente puede ser pulmonar. Los ojos se localizan en ambos lados del cráneo (Figura 1). Su hábitat natural son aguas de baja profundidad y lénticas, con promedio de temperatura de 5-10°C en invierno y 22 °C en verano. Presenta un ciclo de vida generalmente acuático denominado neotenia, la cual se caracteriza por no sufrir metamorfosis de forma natural (transición de vida acuática a terrestre en la mayoría de los anfibios), alcanzando la madurez sexual en su forma larval. Posee un genoma de aproximadamente 30 Gb, el cual aún no ha sido secuenciado (Aguilar, 2005; Steward *et al.* 2013; Zamora, 2011).

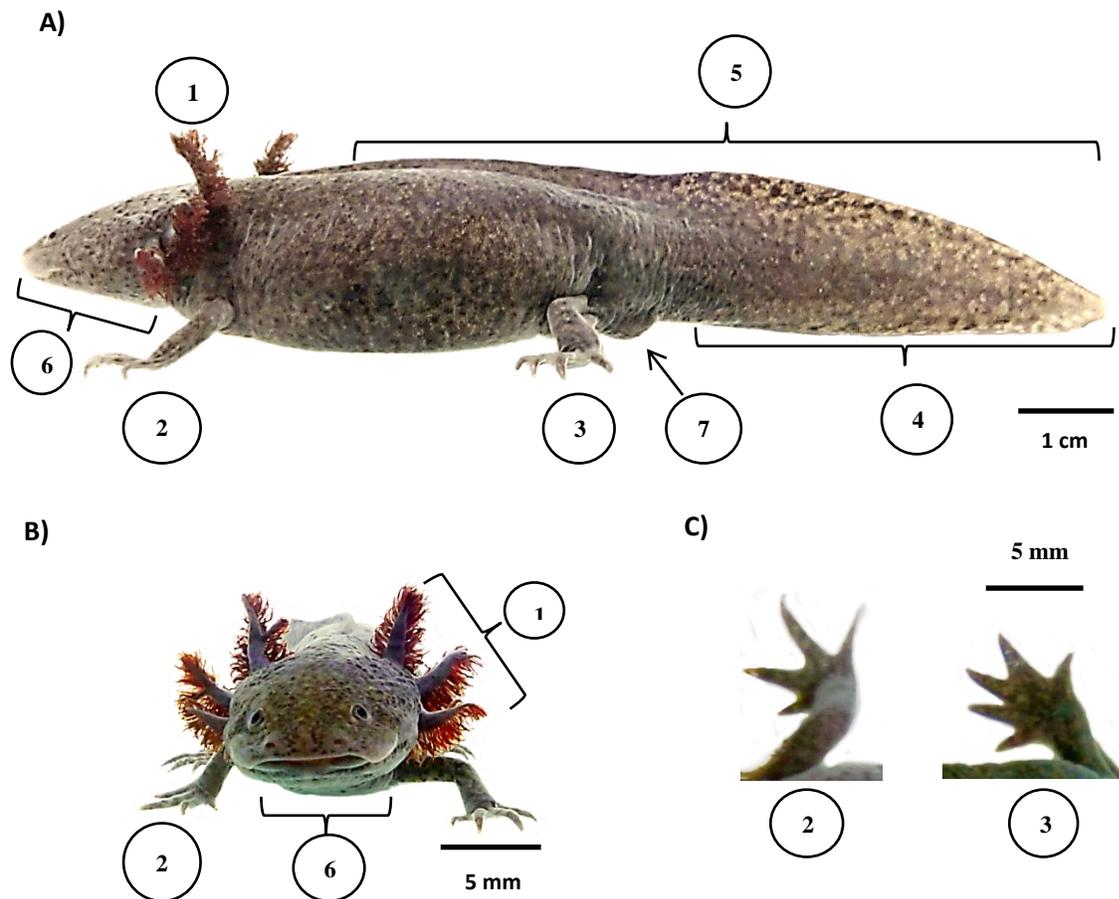
**Tabla 1.-** Clasificación taxonómica de *A. mexicanum* (Aguilar, 2005; Zamora, 2011).

Clasificación taxonómica de <i>Ambystoma mexicanum</i>	
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Anfibia
Orden	Caudata
Sub-Orden	Salamandroidea
Familia	Ambystomatidae
Género	<i>Ambystoma</i>
Especie	<i>Mexicanum</i>
Nombre científico	<i>Ambystoma mexicanum</i>
Nombre común	Ajolote



Una peculiar característica de *A. mexicanum* es que posee la mejor capacidad de regeneración dentro de todos los vertebrados. Se sabe que estos organismos pueden regenerar diversas partes de su cuerpo como: extremidades (anterior y posterior), cola, branquias, así como segmentos de algunos órganos, dentro de los cuales se encuentran: retina, corazón, hígado, cerebro, entre otras (Zamora, 2011).

Esta increíble capacidad de regeneración lo ha convertido en un modelo de estudio de regeneración en vertebrados en distintas áreas de investigación (Zamora, 2011).



**Figura 1.-** Morfología de *A. mexicanum*. (A) Visión lateral, (B) visión frontal, (C) Diferencias en dígitos de ambas extremidades de *A. mexicanum*. 1) Branquias, 2) extremidad anterior (4 dígitos), 3) extremidad posterior (5 dígitos), 4) cola, 5) aleta dorsal, 6) región gular, 7) cloaca (Imagen propia).

## 1.2.- Regeneración

A través del tiempo, se han propuesto diversas teorías y desarrollado múltiples conceptos que tratan de explicar cómo se recupera un segmento de un órgano o tejido dañado, e incluso aún más extraordinariamente como se recupera completamente una estructura compleja cuando se pierde bajo alguna circunstancia. La regeneración supone la sustitución del tejido o conjunto de tejidos perdidos por otro igual que conserva la estructura fisiológica y funcionalidad del original (Agata *et al.* 2007; Carlson, 2005).

El número de especies capaz de regenerar por lo menos en algún aspecto, es inmenso, así como la cantidad de estructuras capaces de regenerarse (Figura 2). Sin embargo algunos organismos, son considerados los campeones de la regeneración, como lo son Planaria (*Schmidtea mediterránea*) y Hidra (*Hidra spp.*), capaces de regenerar todo su cuerpo a partir de un pequeño segmento del mismo, considerándolos modelo de estudio del proceso de regeneración (Agata *et al.* 2007; Carlson, 2005).

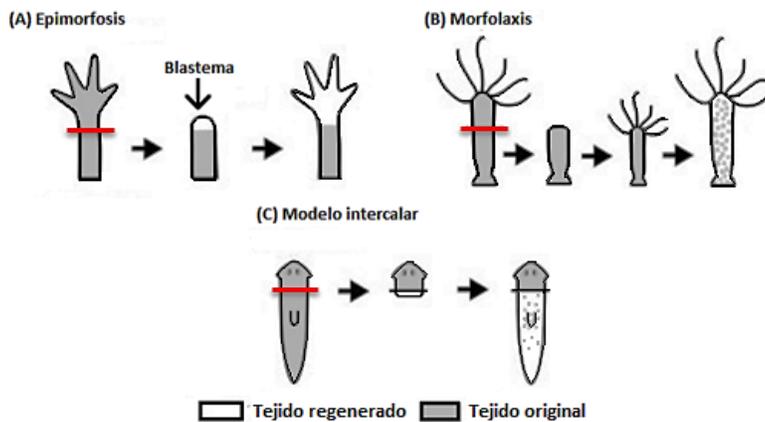
Sin embargo, dentro de los organismos vertebrados, los anfibios son modelo de estudio de regeneración (Salamandras y tritones), ya que pueden regenerar una gran variedad de estructuras (extremidades, cola, branquias, etc) y tejidos específicos (segmentos de corazón, hígado, sistema nervioso, etc.) (Agata *et al.* 2007; Carlson, 2005).

Nivel biológico	Ejemplos	Pre-amputación	Post-amputación	Regeneración	<i>A. mexicanum</i>
Todo el cuerpo	A partir de un segmento del cuerpo				✗
Estructural	Extremidades, aletas, tentáculos, etc.				✓
Segmentos de órganos	Corazón, hígado, etc.				✓
Segmentos de tejido	Epidermis, cornea, etc.				✓
Nivel celular	Axón, fibra muscular, etc.				✓

**Figura 2.-** Regeneración en distintos niveles de organización biológica. Algunas especies particularmente son capaces de regenerar en todos los niveles descritos, mientras que algunas otras especies solo pueden regenerar en algunos de los distintos niveles. Las líneas punteadas rojas indican el plano de amputación, las líneas rojas indican la superficie de la herida y los segmentos azules indican el tejido regenerado. Se observa el nivel de organización biológica que es capaz de regenerar *A. mexicanum* (modificado de Bely and Nyberg, 2009).

La regeneración puede desarrollarse principalmente a través de dos distintos mecanismos, epimorfosis y morfólaxis. Se denomina epimorfosis a la restauración morfológica y funcional de una estructura perdida en un organismo mediante la formación de un blastema, el blastema es un conjunto de células indiferenciadas y proliferantes que darán lugar a todos los tejidos de la estructura a regenerar (Figura 3A). Por otro lado, la morfólaxis implica un remodelado de los tejidos preexistentes de forma que parte de los tejidos viejos restauran aquellos tejidos que se han perdido. Se forma así, un tejido completo o incluso un organismo nuevo sin que exista un proceso de indiferenciación y proliferación activo, es decir, sin la formación de un blastema en el fragmento dañado (Figura 3B). La clave para diferenciar ambos procesos es, por tanto, la existencia del blastema, concepto directamente relacionado con una des-diferenciación y proliferación celular activa (Agata K., *et al.* 2007). Además se estima que ambos procesos pueden estar presentes en un mismo organismo o incluso combinarse, como es el caso del modelo de “regeneración intercalar” presente en la Planaria (*S. mediterránea*) (Figura 3C) (Agata *et al.* 2007).

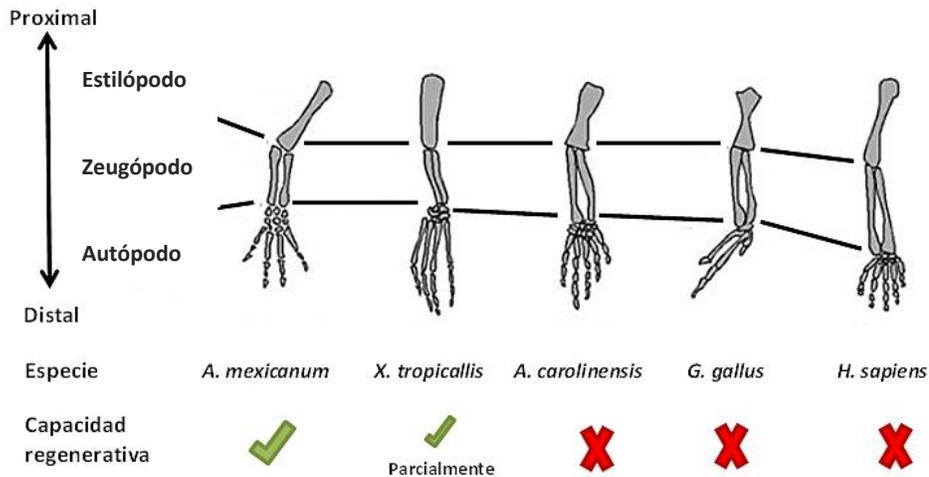
La regeneración de extremidades es uno de los fenómenos más estudiados en el campo de la biología regenerativa, siendo clasificada generalmente dentro de la regeneración epimórfica dado que presenta la formación de un blastema. *A. mexicanum* es capaz de regenerar las extremidades amputadas de forma 100% funcional; es por esto que *A. mexicanum* ha sido el principal modelo para el estudio de la regeneración en organismos vertebrados (Yokoyama, 2008; Carlson, 2005).



**Figura 3.-** Mecanismos de regeneración: (A) Epimorfosis: Des-diferenciación, proliferación y formación de blastema a partir del tejido existente, (B) Morfolaxis: Remodelación a partir del tejido existente, (C) Modelo de regeneración intercalar: Formación de blastema y remodelación a partir del tejido existente. Las líneas rojas indican el plano de amputación, así como las áreas blancas indican el tejido regenerado y las áreas grises indican el tejido original (Modificado de Agata *et al.* 2007).

### 1.3.- Regeneración de extremidad

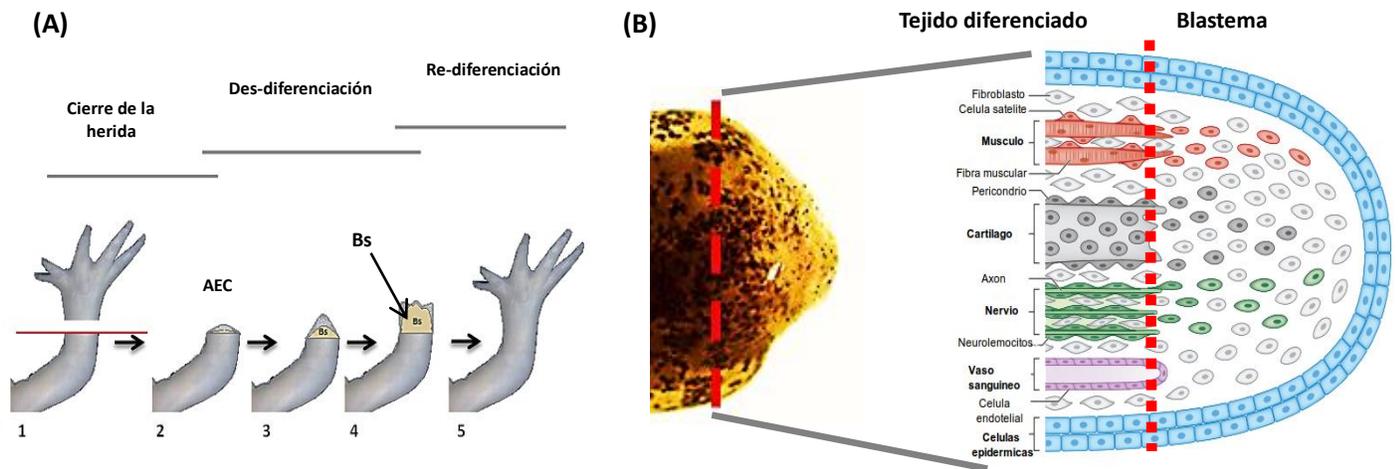
Entre los tetrápodos, los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo de las extremidades son muy conservados. El patrón esquelético de las extremidades es altamente conservado entre los tetrápodos, sin embargo su capacidad regenerativa es demasiado variable, restringiéndose a sólo algunas especies (Figura 4). Generalmente la regeneración de extremidades ocurre vía epimorfosis ya que presenta la formación de blastema. (Yokoyama, 2008).



**Figura 4.-** Patrón esquelético y capacidad regenerativa de extremidad en tetrápodos. Los anfibios como pueden regenerar sus extremidades total y funcionalmente (*A. mexicanum*) o parcialmente durante estadios larvarios (*X. tropicallis*), sin embargo en el caso de los reptiles (*A. carolinensis*), aves (*G. gallus*) y humano (*H. sapiens*) no muestran dicha capacidad (modificado de Yokoyama, 2008).

Una vez amputado el miembro, los pasos subsecuentes en el proceso de regeneración vía epimorfosis están definidos en distintos estadios (Figura 5A). La amputación de la extremidad resulta en una rápida migración de células epiteliales para el cierre de la herida así como en el cambio de la morfología y remodelación de células mesenquimales subyacentes (cierre de la herida y des-diferenciación) por acción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) dando origen a la capa apical epitelial (AEC), la AEC prolifera dando origen al blastema (Anoop and Andrés, 2015; Agata *et al.* 2007; Carlson, 2005).

Los tejidos regenerados parecen partir de linajes celulares restringidos, de tal manera que el músculo regenerado se deriva de células miogénicas, y el tejido conectivo se deriva de las células del tejido conectivo del muñón (Figura 5B). El blastema continúa creciendo distalmente a través de la proliferación celular, dando origen al tejido perdido (re-diferenciación). Durante este proceso, se requiere una estrecha interacción entre el blastema y la AEC, la cual es esencial para el crecimiento de la extremidad regenerada. Se ha demostrado que la regeneración de extremidad es nervio dependiente, ya que en estudios previos de regeneración de extremidad en *A. mexicanum*, se ha retirado la nervadura, lo que conllevó a la pérdida de la capacidad de regeneración. (Anoop and Andrés, 2015; Agata *et al.* 2007; Carlson, 2005).



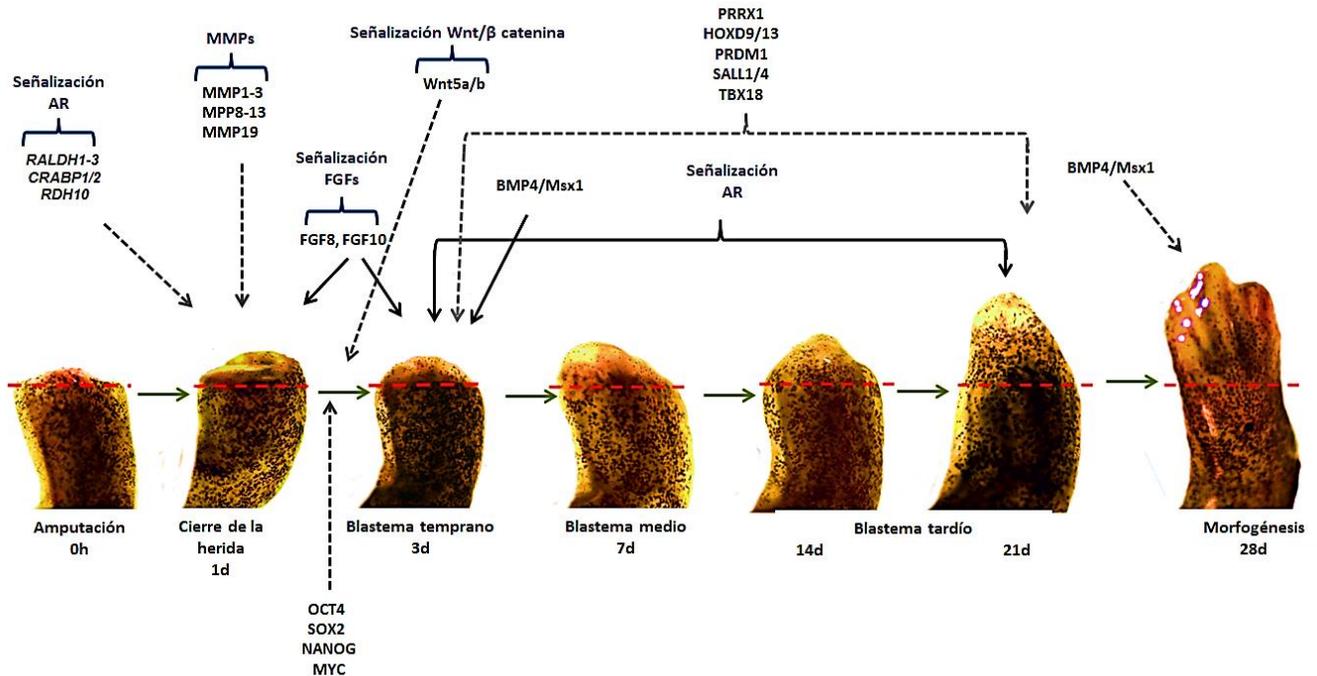
**Figura 5.-** (A) Proceso de regeneración de extremidad en anfibios urodelos: 1) Muñón de la extremidad después de la amputación, 2) Cierre de la herida y formación de la capa apical epitelial (AEC), 3) Formación temprana del blastema (Bs) a partir de AEC, 4) Formación tardía del blastema (Bs) e inicio de la re-diferenciación y morfogénesis, 5) Regeneración total de la extremidad. (B) Componentes del blastema en regeneración de extremidad: células musculares (rojo), cartílago (gris oscuro), fibroblasto (gris claro), neurolemocitos (verde). La línea punteada roja delimita el área de formación del blastema (células indiferenciadas) y el tejido diferenciado (modificado de Eugen and Tanaka, 2011).

Durante varios años se ha estudiado el fenómeno de generación de extremidad en distintos modelos de estudio, lo cual ha permitido identificar múltiples genes necesarios para una correcta regeneración de la extremidad (Figura 6). Algunos de estos genes y conjunto de genes son:

- **Metaloproteinasas de matriz (MMPs):** son proteasas capaces de digerir colágeno en aquellos tejidos que sufren remodelación. Algunas MMPs se activan durante la regeneración de extremidad en salamandras y tritones durante el cierre de la herida disminuyendo la inflamación del tejido dañado. Se ha observado que varias MMPs tienen expresión durante los primeros días de la regeneración de extremidad de *A. mexicanum* como lo son: MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP19. Se ha demostrado que la inhibición de las MMPs (MMP3/10a, MMP3/10b y MMP) afecta parcialmente la capacidad de regeneración de extremidad (Santos *et al.* 2011; Steward *et al.* 2013; Vinarsky *et al.* 2005).

- **Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs)**, son factores de crecimiento que aumentan la actividad mitótica, facilitando la proliferación de múltiples células precursoras del tejido fibroso. Algunas interacciones epitelio-mesénquima son mediadas por FGFs y son necesarias para la regeneración de extremidad. Múltiples estudios han demostrado que FGF-8 y FGF-10 son expresados en el blastema durante la regeneración de extremidad en *A. mexicanum* así como en *X. tropicallis* (rana africana), FGF-8 se expresa en la AEC mientras que FGF-10 se expresa en el tejido del mesénquima. Se ha observado que FGF-8 y FGF-10 no son expresados en organismos que no son capaces de regenerar tras perder una extremidad. (Yokoyama *et al.* 2001; Yokoyama, 2008).
- **Wnt/ $\beta$ -catenina**, es una vía de señalización altamente conservada entre vertebrados que controla la proliferación celular durante la embriogénesis. Se ha observado que la vía de señalización de la Wnt /  $\beta$ -catenina está involucrada en la regeneración de la aleta caudal de *D. rerio* (pez cebra) y la cola de *A. mexicanum*. Por ejemplo se observó que la inhibición de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina disminuía la tasa de regeneración en *A. mexicanum*, así como la sobre-expresión de dicha ruta incrementa la capacidad regenerativa de *X. tropicallis* en estadio juvenil, en el cual su capacidad de regeneración de forma natural es nula (Kawakami *et al.* 2006).
- **BMP/Msx**, las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) son un subconjunto de proteínas de la súper-familia de factores de crecimiento transformantes beta (TGF- $\beta$ ). Los BMPs tienen múltiples funciones durante la embriogénesis y organogénesis, durante estos procesos regulan diversas funciones como la proliferación celular, la diferenciación, apoptosis, entre otros. Las proteínas Msx modulan múltiples procesos del desarrollo embrionario como: desarrollo cráneo-facial, desarrollo de extremidades y desarrollo del sistema nervioso. Las Msx se expresan a menudo en regiones similares donde están presentes los BMPs y regulan su función. La señalización de BMP4/Msx1 está involucrado en la regeneración de la punta de los dígitos de ratón, en la cual Msx1 regula BMP4. Los ratones fetales y neonatales pueden regenerar la punta de los dígitos, y la capacidad de regeneración se correlaciona con la regulación de la expresión del gen Msx1. La señalización de BMP es necesaria para la regeneración de extremidades en *X. tropicallis* y *A. mexicanum* mediante la co-expresión de BMP7 junto a FGF2 y FGF8 (Beck *et al.* 2006; Han *et al.* 2003; Makanae *et al.* 2014).
- **Señalización del Ácido Retinoico (AR)**: El ácido retinoico es una molécula de señalización que guía el desarrollo embrionario en los organismos vertebrados, su aumento o deficiencia durante el desarrollo afecta la morfogénesis del embrión. Se ha observado que los genes involucrados en la ruta de señalización del ácido retinoico son sobre-expresados durante la regeneración de extremidad en *A. mexicanum*, estos incluyen a ALDH1A3, CRABP1, CRABP2 y *rdh10*. La señalización del ácido retinoico se encuentra presente durante el cierre de la herida, la formación y proliferación del blastema (Monaghan *et al.* 2012; Monaghan and Maden, 2012).

- **Proto-oncogenes:** Son genes que pueden activar procesos dirigidos hacia el crecimiento y proliferación celular. Se ha observado que durante el proceso de regeneración de *A. mexicanum* múltiples proto-oncogenes son activados, como por ejemplo: Oct4, Sox2, Nanog, Myc, ATF3, Klf4, Klf2, JUN3, EGR1, NR4A2, FOS y FOXO1. Se presume que estos proto-oncogenes son necesarios para la formación del blastema, mantenimiento de la desdiferenciación y proliferación celular. Estos procesos son necesarios para la regeneración de extremidad (Knapp *et al.* 2013; Steward *et al.* 2013).



**Figura 6.-** Se puede observar la regeneración de extremidad así como los distintos genes y rutas de señalización (flechas negras) descritos en múltiples estudios, la correcta regulación de estos genes y rutas de señalización son necesarios para una correcta regeneración de la extremidad. Se pueden observar algunos genes que presentan cambios en su nivel de expresión durante etapas específicas de la regeneración y participan dentro de las rutas de regulación descritas (flechas punteadas grises). Se observa el plano de amputación marcado por las líneas punteadas rojas (imagen propia).

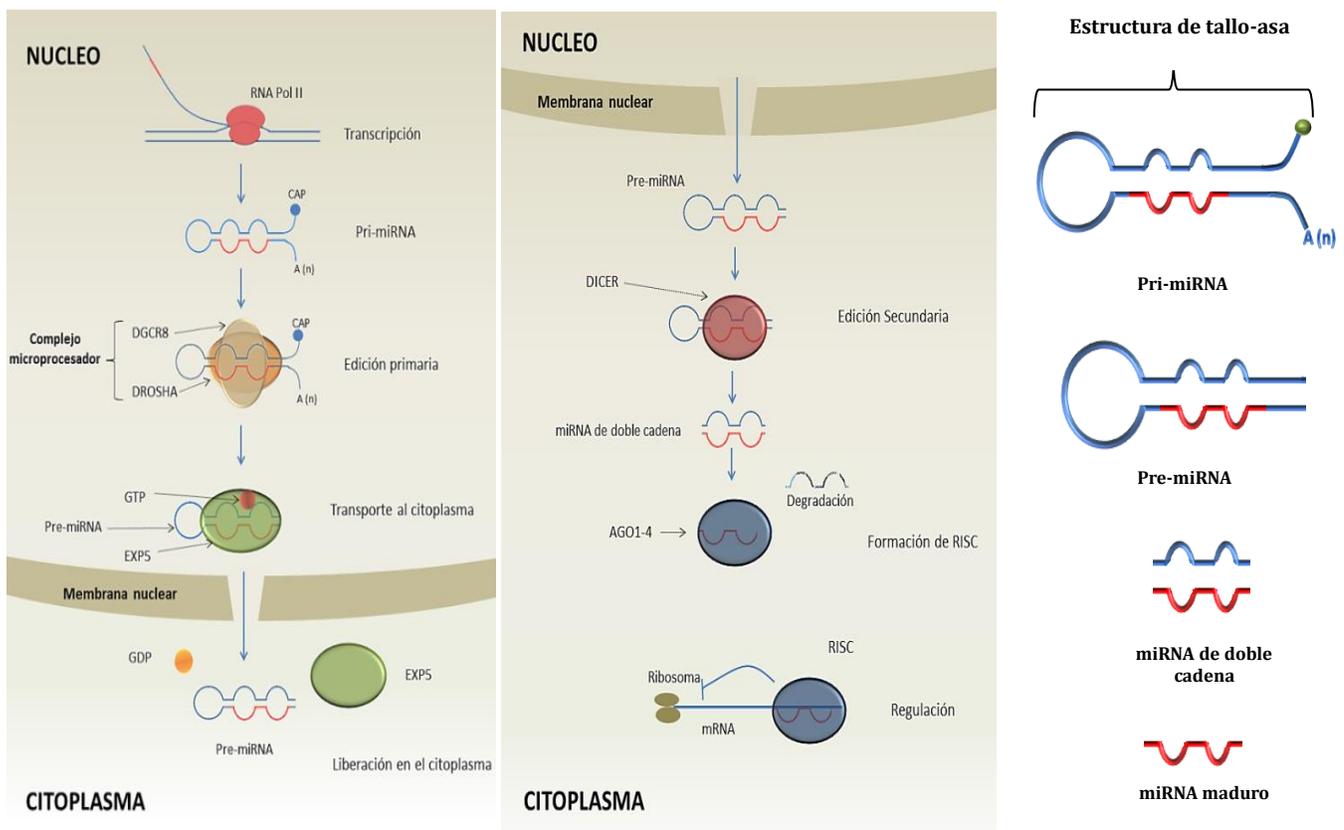
Varios de los genes involucrados en la regeneración de extremidad han sido reportados como blancos de múltiples miRNAs (Sehm *et al.* 2009).

#### 1.4.- miRNAs durante la regeneración

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños de aproximadamente 18-24 nucleótidos, que pueden unirse de forma complementaria a la secuencia de su gen blanco mediante la complementariedad parcial (principalmente en su extremo 3' UTR). Los nucleótidos en la posición 2-8 son conocidos como región semilla, ya que estos son esenciales para el reconocimiento de sus blancos (complementariedad perfecta de estos 7 nucleótidos). Los miRNAs regulan de forma negativa la expresión post-trasncripcional del gen blanco mediante distintos mecanismos como son deadenilación, represión de la traducción, entre otros (Minju and Kim, 2014).

Los miRNAs maduros (de aproximadamente 18-22 nucleótidos) son formados a partir de una secuencia primaria (pri-miRNA) aproximadamente mayor a 1kb, que es transcrita en el núcleo por la RNA-polimerasa II (RNA-Pol II). Posteriormente el pri-miRNA sufre una edición de su secuencia por el complejo micro-procesador formado por DROSHA y DGCR8, generando una secuencia precursora (pre-miRNA). Este pre-miRNA es transportado al citoplasma donde sufre otra edición por la enzima DICER, generando un miRNA de doble cadena. El miRNA de doble cadena es reconocido generalmente por la proteína Argonauta 2 (AGO2), con el cual formara el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), en el cual es degradada una cadena del miRNA de doble cadena. El complejo RISC conserva una cadena del miRNA que servirá como RNA guía, los genes objetivo son identificados por la complementariedad parcial de la secuencia del transcrito mensajero (mRNA) blanco (Figura 7) (Holman *et al.* 2012; Minju and Kim, 2014).

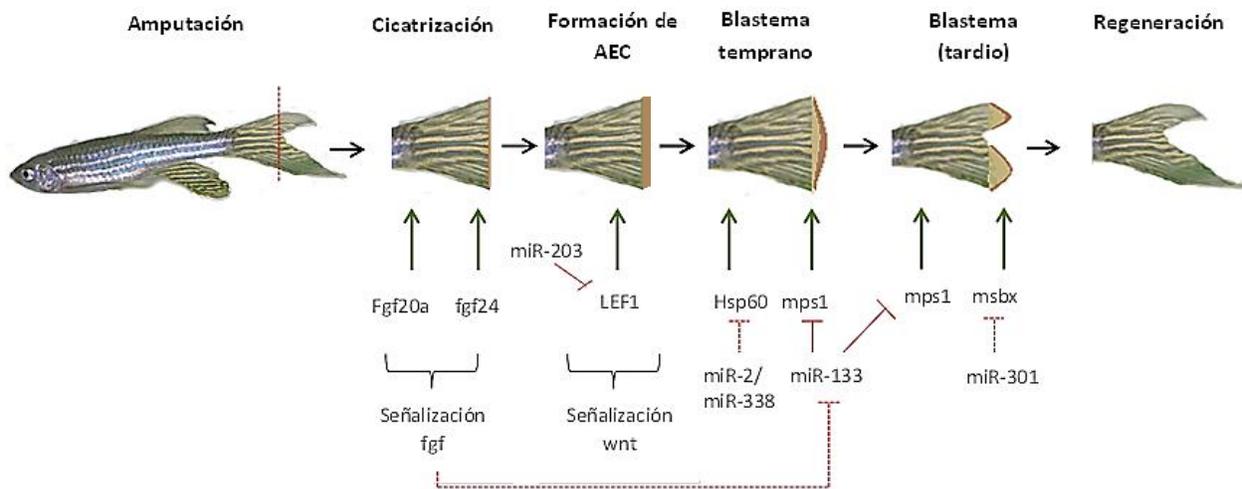
Los miRNAs regulan múltiples funciones celulares incluyendo la especificación celular, diferenciación, proliferación y metabolismo. Tienen un importante papel en la progresión o represión de múltiples enfermedades. Se ha estudiado el perfil de expresión de algunos miRNAs durante procesos de desarrollo, diferenciación celular y regeneración. Se ha identificado un patrón de expresión común, el cual se presenta con un grupo de miRNAs expresados diferencialmente durante estados de diferenciación. Mientras que otra pequeña cantidad expresada en células madre o en estadios tempranos de desarrollo, que se han correlacionado con mantenimiento de la troncalidad celular (Sehm *et al.* 2009; Thatcher and Patton, 2010).



**Figura 7.-** Biogénesis y características principales de los miRNAs: (A) Vía de biogénesis canónica dependiente de DROSHA y DICER de miRNAs, (B) Secuencia de maduración de miRNAs, partiendo generalmente de un miRNA-primario, hasta llegar a su forma madura que servirá como guía del complejo RISC contra sus genes blanco (Imagen propia).

Algunos miRNAs han sido observados por regular distintos estadios de regeneración a través de sus genes blanco en múltiples especies, como lo son: *Hidra*, *Planaria*, *D. rerio* y *A. mexicanum*. Se ha observado que la maquinaria de biogénesis de miRNAs es esencial para la regeneración de la aleta caudal en *D. rerio*, ya que cuando se bloquea la expresión de DICER causa defectos en la regeneración (Thatcher and Patton, 2010).

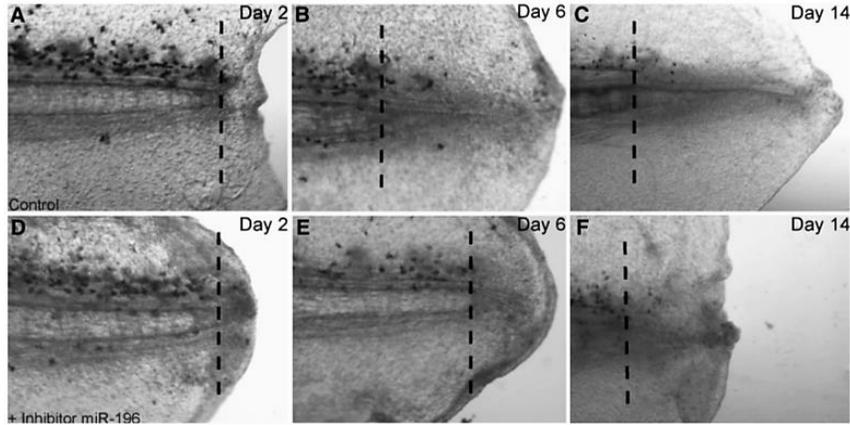
Se ha observado en *D. rerio* a miR-133 el cual regula a *mps1*, una quinasa necesaria para la proliferación y crecimiento del blastema. Otro miRNA es miR-203 que regula la regeneración a través de la supresión de *Lef1*, un factor de transcripción requerido para la transcripción dependiente de la ruta de Wnt, ruta de señalización necesaria en las primeras etapas de la regeneración. Se ha observado la regulación de otros miRNAs, como lo son miR-2 y miR-338 los cuales podrían regular la expresión de *Hsp60* el cual contiene un sitio blanco dentro de su secuencia, *Hsp60* es una proteína de choque térmico necesaria para el mantenimiento del blastema. miR-301 posiblemente regula *msbx1*, presumiblemente regulando la proliferación del blastema. miR-200b se ha visto sobre-expresado en la regeneración de aleta caudal de *D. rerio*, posiblemente regulando a *BMP3* (Figura 8) (Thatcher *et al.* 2008; Thatcher and Patton, 2010; Viravuth *et al.* 2008).



**Figura 8.** Estadios de la regeneración de aleta caudal en *D. rerio*, en la cual se puede observar la regulación negativa de múltiples genes por miRNAs. Algunos miRNAs regulados negativamente durante el proceso de regeneración de aleta caudal son: miR-203, miR-133, miR-2, miR-338 y miR-301. Se pueden apreciar los blancos de estos miRNAs (líneas rojas) durante los distintos estadios de la regeneración, así como algunos blancos predichos (líneas punteadas rojas). Se ha planteado la posibilidad que la ruta de señalización de fgf esté involucrada en la represión de miR-133 en inicios de la regeneración. (Imagen propia).

Los estudios de miRNAs durante regeneración de *A. mexicanum* son pocos, siendo en general muy limitado lo descrito sobre miRNAs en esta especie. Uno de los miRNAs identificados durante el proceso de regeneración es miR-196 el cual fue identificado en la regeneración de cola. miR-196 es sobre-expresado durante este proceso, regulando de forma negativa a la proteína Pax7 (Figura 9). A su vez, Pax7 actúa directamente sobre BMP4 y Msx1, que regulan el patrón de crecimiento y la proliferación celular durante la regeneración de cola (Sehm *et al.* 2009).

El papel de señalización de BMP en el control de proliferación de células de la médula espinal se ha estudiado ampliamente durante el desarrollo embrionario en pollo (*G. gallus*). Se cree que la señalización por BMP está mediada a través de la vía de señalización Wnt. La co-expresión de BMP7 junto a FGF2 y FGF8 induce la regeneración de extremidad a partir de lesiones en la piel en *A. mexicanum* (Sehm *et al.* 2009; Makanae A. *et al.* 2014).

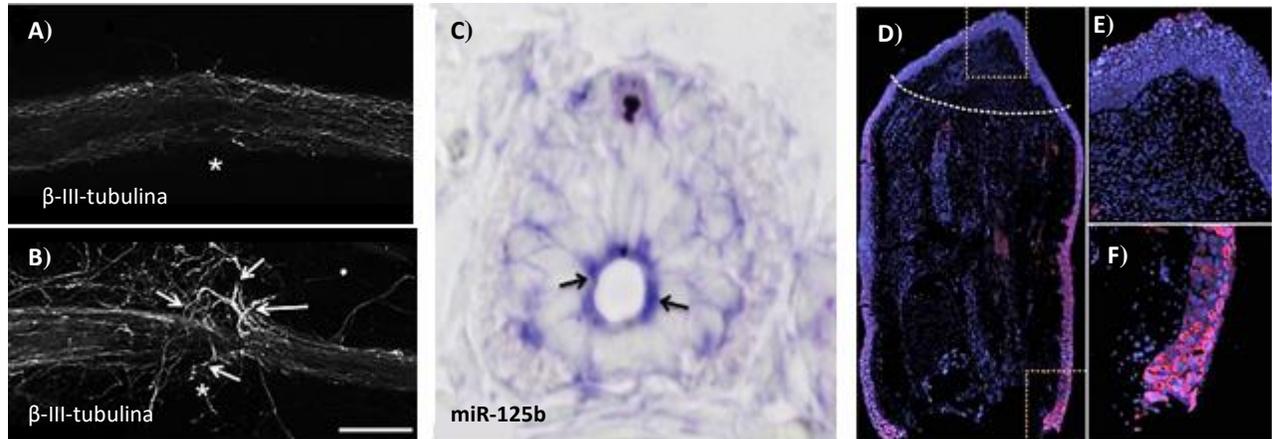


**Figura 9.-** Regeneración de cola de *A. mexicanum* 2,6 y 14 días post-amputación. (A-C) Expresión normal de miR-196 durante la regeneración de cola: (A) Cierre de la herida, (B) Formación del blastema, (C) Diferenciación y regeneración completa del tejido amputado (n=30). (D-F) Tratamiento con inhibidor de miR-196 : (D) Cierre de la herida, (E) Formación del blastema (demasiado pequeño), (F) A los 10 días se puede observar células diferenciadas, sin embargo la sección regenerada es mucho menor (n=35). La línea punteada indica el plano de amputación (Tomado de sehm *et al.* 2009).

Otro miRNA que se ha estudiado durante la regeneración de cola de *A. mexicanum* es miR-125b, la regulación negativa de miR-125b permite la expresión de SEMA4D una semaforina involucrada en la señalización de crecimiento axonal (Figura 10A y 10B). Se encontró que miR-125b es sobre-expresado en las células gliales alrededor de la espina dorsal a las 0 post-amputación (Figura 10C), mientras que SEMA4D no fue perceptible en este tiempo; SEMA4D fue perceptible a los 7 días post-amputación, cuando miR-125b es menos expresado (Diaz *et al.* 2014).

Algunos miRNAs han sido identificados durante la regeneración de extremidad anterior en *A. mexicanum* como: miR-195, miR-499 y let-7g los cuales son regulados de forma negativa durante la formación del blastema (17 días post-amputación). De forma contraria miR-21 se sobre-expresa al día 17 post-amputación, regulando de forma negativa Jagged 1 (*jag1*) (Figura 10D, 10E y 10F), el cual es un ligando de la vía de señalización de Notch, y un objetivo conservado evolutivamente de la ruta de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina. *Jag1* posee un papel activo en el desarrollo embrionario, durante el desarrollo de extremidades (Holman *et al.* 2012).

Se ha sugerido que los miRNAs regulados de forma negativa durante la formación del blastema, participan en la conservación del estado de diferenciación celular, y por tanto están estrechamente relacionados con la regulación de proliferación y crecimiento celular. Las familias de miRNAs, let-7 y miR-125 son familias ampliamente conservadas entre múltiples especies como los son vertebrados e invertebrados. Estas familias de miRNAs se han visto implícitas en el mantenimiento de los estadios de diferenciación celular en múltiples líneas celulares y durante estadios del desarrollo embrionario y larvario de diversos organismos (Holman *et al.* 2012).

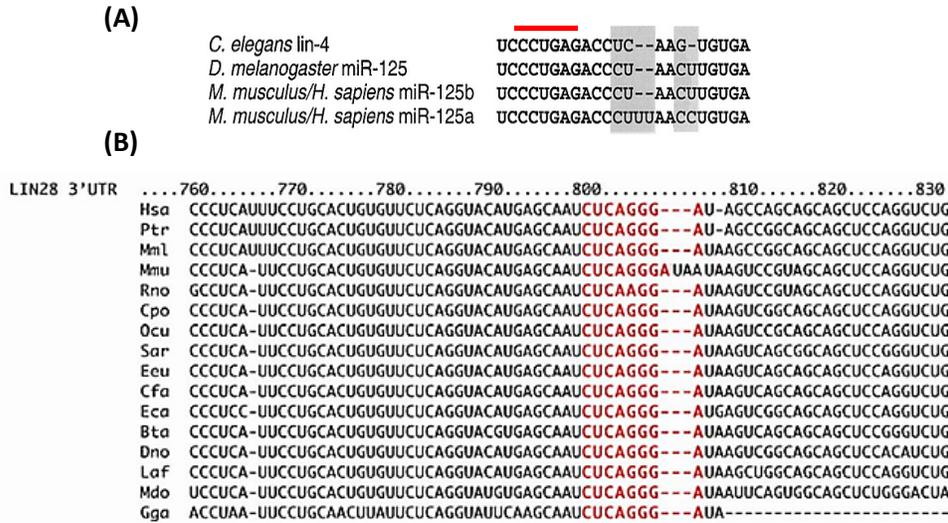


**Figura 10.-** Nivel de expresión de miR-125 durante regeneración de médula espinal en *A. mexicanum*. (A) Tinción Whole-mount anti- $\beta$ -III-tubulina en ajolotes control (n=42), con regulación negativa de miR-125b, se aprecia un crecimiento correcto de los axones en el sitio de la lesión (asterisco), (B) Sobre-expresión de miR-125b por micro inyección de miR-125b-RNA-mimic 7 días post-amputación, se observan defectos en el crecimiento de los axones en el sitio de la lesión (asterisco) (n=40), (C) Se observa la expresión de miR-125b por hibridación *in situ* en las células gliales alrededor de la medula espinal (flechas negras) a las 0 h post-amputación. (D) Corte longitudinal de la extremidad anterior durante a los 17 días post-amputación. Se observa la sobre-expresión de jag1 por inmunotinción (rojo), la cual se puede observar en la región proximal del tejido (recuadro inferior), mientras que en el blastema no presenta expresión (recuadro superior). (E) Acercamiento al blastema y ausencia de expresión de jag1. (F) Acercamiento al tejido proximal en el cual se muestra la sobre-expresión de jag1 (rojo) en la membrana de células de epidermis (tejido diferenciado), el núcleo celular se muestra teñido con DAPI (azul) (Modificado de Díaz et al. 2014; Holman et al. 2012).

### 1.5.- Familia miR-125

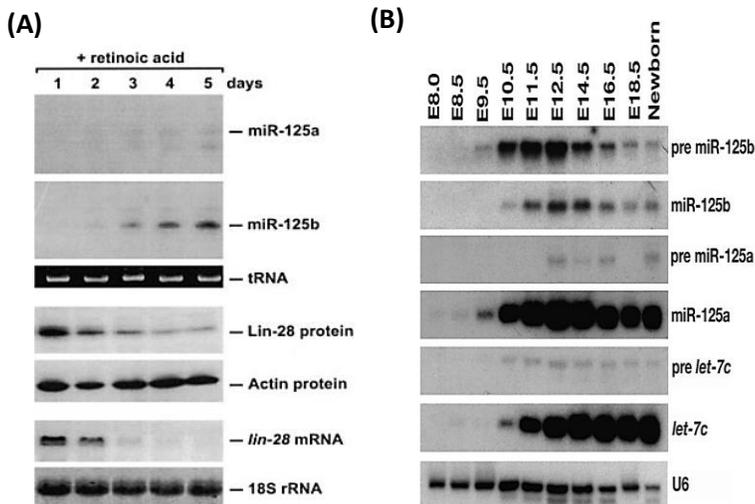
La familia miR-125 es una importante familia de miRNAs que ha sido ampliamente descritas por su papel en diversos tipos de cáncer. La familia miR-125 fue descrita por primera vez en el año 2002 por Quintana y colaboradores, quienes identificaron varios miRNAs en ratón (*M. musculus*). El miRNA “miR-125” fue identificado en el cerebelo de ratón, presentando 2 secuencias con alta similitud a lin-4, el cual fue el primer miRNA en ser descrito en el nematodo *C. elegans* en el año 1993. Lin-4 regula 2 proteínas heterocrónicas (lin-41 y lin28), las cuales son necesarias para la transición de estadios del desarrollo larvario de *C. elegans*. Esta similitud llevó a pensar que se trataba de la secuencia ortóloga de lin-4 en los vertebrados (Figura 11A) (Lagos et al. 2002; Sun et al. 2013).

Posterior a la identificación de la familia miR-125 se predijo que los miembros descritos (miR-125a y miR-125b) regulaban la expresión de los genes ortólogos en vertebrados de lin-41 y lin 28 los cuales fueron identificados en *M. musculus* y *H. sapiens*. Los sitios de reconocimiento de miR-125 en el sitio 3' UTR de lin 28 estan altamente conservados en ambas especies, así como en otros organismos. (Figura 11B). En el 2005 Maller y colaboradores observaron el patrón de expresión de miR-125a y miR-125b durante el desarrollo embrionario de *M. musculus* así como el patrón de expresión de uno de sus blancos predichos (lin-41) (Figura 12A) ( Maller et al. 2005; Wu and Belasco, 2005; Wong et al. 2012).



**Figura 11.-** (A) Alineamiento de la secuencia de miR-125a y miR-125b de *D. melanogaster*, *H. sapiens* y *M. musculus* contra lin-4 de *C. elegans*, donde se aprecia la homología entre ambas (la línea roja muestra la región semilla 100% conservada), se puede observar una variación en la región central (inserciones di-uridinas para miR-125a y mono-uridina para miR-125b), las cuales se predice que no interfieren en el reconocimiento del blanco ya que forman plegamiento al unirse a sus secuencias blanco (complementariedad parcial). (B) Alineamiento de la región 3' UTR del gen lin28 de múltiples especies, en el cual se puede apreciar la conservación del sitio de reconocimiento de miR-125a/b (sitio de unión de región semilla en color rojo) (Tomado de [www.TargetScan.org](http://www.TargetScan.org), 2014).

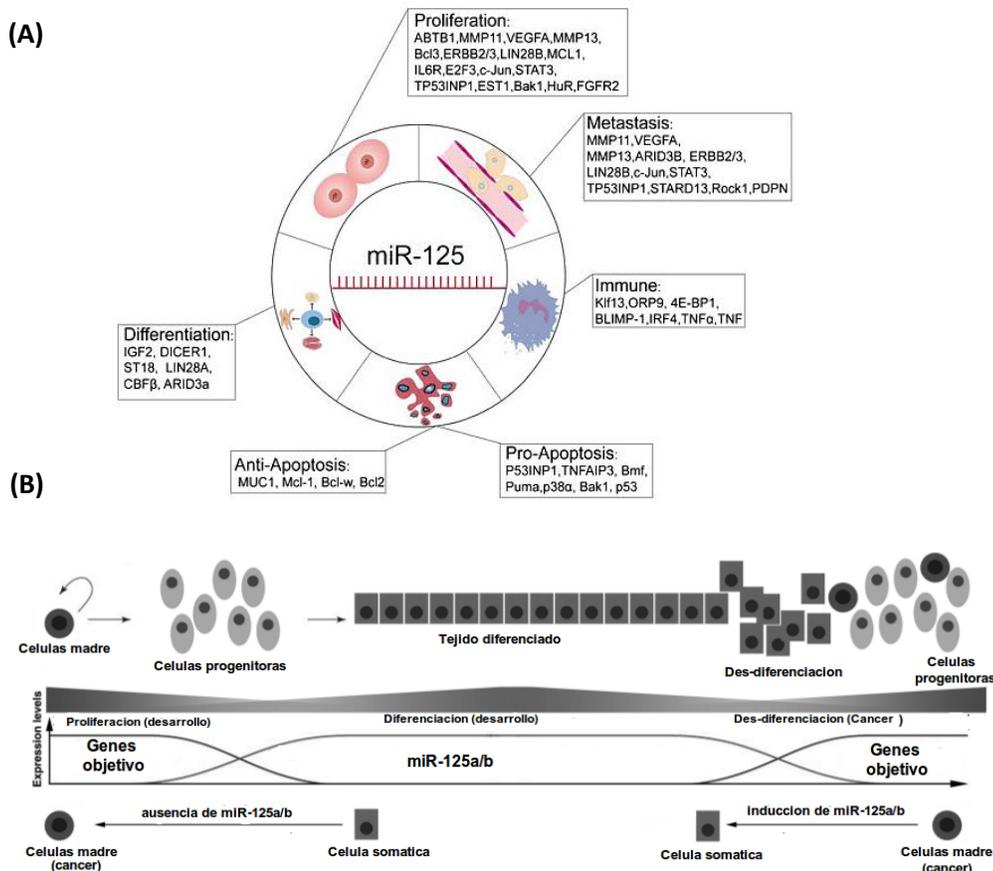
Maller y colaboradores lograron observar la correlación entre el perfil de expresión de ambos, donde miR-125a y miR-125b se comenzaban a expresar cuando lin-41 sufría una regulación negativa en estadios avanzados del desarrollo embrionario de *M. musculus* (organogénesis) (Figura 12B). En un estudio posterior se observó la regulación de lin 28 por miR-125b en cultivo de células de carcinoma embrionario de ratón (P19), en las cuales se observó que miR-125b regulaba negativamente la expresión de lin 28, permitiendo la diferenciación a células neuronales (Figura 12A) (Maller *et al.* 2005; Wong *et al.* 2012; Wu and Belasco, 2005).



**Figura 12.-** (A) Cambios en los niveles de expresión de miR-125a/b y lin-28 durante la inducción con ácido retinoico de diferenciación de células P19 en células neuronales, se puede observar la correlación inversa entre la expresión del gen objetivo (lin 28) y miR-125b. (B) Expresión de pre-miR-125a/b y miR-125a/b durante embriogénesis de *M. musculus*, se observa como aumenta el nivel de expresión en los estadios tardíos de la embriogénesis hasta el nacimiento (Wu and Belasco, 2005; Maller *et al.* 2005).

Estudios posteriores revelaron la importancia de la regulación por miR-125 en distintos tipos de cáncer, funcionando como un supresor o inductor de tumores dependiendo del contexto celular en el cual estaba implicado. Esto llevo a estudiar la regulación de la proliferación, apoptosis y ciclo celular modulada por miR-125, encontrando la regulación de múltiples blancos durante este tipo de trastorno celular. Un ejemplo de la importancia de la modulación de miR-125, es su papel como supresor de tumores en la regulación de la vía de ErbB, un proto-oncogén que se sobre-expresa durante leucemia mieloide aguda y el cáncer de mama. Otros objetivos son: E2F3 y PPP1CA-Rb en cáncer gástrico. Algunos de los objetivos de miR-125 asociados a proliferación, migración celular y metástasis son: HuR, Rock-1, PDPN, STAT3, STARD13, MMP11, MMP13, KLF13, c-Jun, ARID3B, ARID3A, LIN28A, VEGF-A, IGF-II y FGFR2. (Figura 13A) (Scott *et al.* 2007; Sun *et al.* 2013; Wu *et al.* 2014; Ufkin *et al.* 2014; Xiaomin *et al.* 2010).

Debido los múltiples blancos de miR-125 (factores de transcripción, metaloproteinasas de matriz, factores de crecimiento, etc.) en múltiples procesos celulares, miR-125 se ha considerado un miRNA con gran potencial biomédico, como posible auxiliar en terapia contra múltiples tipos de cáncer o biomarcador de líneas celulares cancerígenas o como un posible inductor de diferenciación (Figura 13B) (Sun *et al.* 2013).



**Figura 13.-** Familia miR-125 en contexto celular y a nivel biológico. (A) Se indican los múltiples procesos celulares en los que está implicado miR-125 a través de la regulación de sus genes objetivo, más de un objetivo se ve implicado en dos o más procesos celulares. (B) Esquema que representa el papel de miR-125 a través del desarrollo y en la presencia de ciertas enfermedades como el cáncer, funcionando como un modulador de pluripotencia (modificado de Sun *et al.* 2013; Xiaomin *et al.* 2010).

## II.- HIPOTESIS

La familia miR-125 regula el estado de diferenciación celular durante la regeneración de extremidad en *Ambystoma mexicanum*.

### III.- OBJETIVOS

**Objetivo general:** Identificar y analizar el perfil de expresión de la familia miR-125 durante la regeneración de extremidad de *Ambystoma mexicanum*.

#### 3.1.- Objetivos específicos

**3.1.1.-** Análisis *in silico* de los miembros de la familia miR-125 (primarios y maduros) en transcriptomas de smRNAs y ncRNAs de *A. mexicanum*.

**3.1.2.-** Análisis *in silico* del perfil de expresión de la familia miR-125 (primarios y maduros) en transcriptoma de smRNAs y ncRNAs *A. mexicanum*.

**3.1.3.-** Predicción *in silico* de los blancos putativos de la familia miR-125 en transcriptoma de cRNAs de *A. mexicanum*.

**3.1.4.-** Análisis del perfil de expresión de la familia miR-125 durante regeneración de extremidad de *A. mexicanum*.

## IV.- METODOLOGIA

### 4.1.- IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE LA FAMILIA miR-125 EN *A. mexicanum*

#### 4.1.1.- Preparación de las librerías de RNAs-pequeños

Para la identificación de los miembros de la familia miR-125 se utilizaron 4 librerías de RNAs pequeños (small RNA-seq) generadas por el Laboratorio de Complejidad Molecular y del Desarrollo (LCMD). Las muestras fueron generadas partir de un *A. mexicanum* hembra en etapa adulta de aproximadamente 18 cm de longitud hocico-cola. Se extrajo RNA total de hígado, cola, extremidad posterior y extremidad anterior siguiendo el protocolo de Trizol. Posteriormente se separaron los RNAs pequeños con una longitud de 18-30 nucleótidos por electroforesis. Separados los RNAs pequeños de cada tejido fueron secuenciadas por la plataforma Illumina high-seq 22000 (Garcia *et al.* Datos no publicados).

Se analizó la calidad de las librerías mediante el programa FastQC v0.10.1. Posteriormente fueron eliminados los adaptadores de la secuencias y las secuencias con calidad menor a 23 y longitud <15 nucleótidos mediante el programa Trimmomatic 0.32 y cutadapt 1.7.1. La lista de adaptadores se encuentra disponible en el **Anexo A**.

Filtradas las secuencias de baja calidad se realizó un análisis de distribución de longitud mediante el paquete de R 3.1 "ShortRead".

#### 4.1.2.- Preparación de las librerías de mRNAs

Se analizaron distintas librerías de RNAs mensajeros (mRNAs) generadas a partir de múltiples tejidos y distintos tiempos de regeneración de extremidad de *A. mexicanum*. Las librerías de tejidos fueron generadas y ensambladas por el Laboratorio de Complejidad Molecular y del Desarrollo (LCMD). Las muestras fueron generadas a partir de una *A. mexicanum* hembra en etapa adulta de aproximadamente 18 cm de longitud hocico-cola. Se extrajo RNA total de corazón, branquias, hígado, cola, extremidad anterior y extremidad posterior siguiendo el protocolo de Trizol. El RNA total de los tejidos fueron secuenciados por la plataforma Illumina high-seq 22000. Las secuencias obtenidas fueron filtradas por el paquete Trimmomatic 0.32 y ensambladas por el paquete Trinity 2.0.6 (Garcia *et al.* Datos no publicados).

Para las librerías de tiempos de regeneración se realizó un ensamble de 12 librerías de mRNAs generadas durante regeneración de extremidad de *A. mexicanum* juveniles entre 4.5-10 cm, amputados en la extremidad posterior en los tiempos: 0 horas, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días y 28 días. Posteriormente fueron secuenciadas por la plataforma Illumina GAI (Stewart *et al.* 2013). Se analizó la calidad de las librerías mediante el programa FastQC v0.10.1. Se eliminaron los adaptadores de la secuencias y las secuencias con calidad menor a 23 y longitud menor a 20 nucleótidos mediante el uso del paquete Trimmomatic 0.32. La lista de adaptadores se encuentra disponible en el **Anexo B**. Filtradas las secuencias de baja calidad se generó un ensamble global de las librerías mediante el programa Trinity 2.0.6 (parámetros default).

#### **4.1.3.- Identificación de los miembros de la familia miR-125 (maduro).**

Se identificó a los miembros de la familia miR-125 mediante análisis de homología de las librerías de RNAs pequeños (smRNAs) contra la base de datos de miRbase 21, la cual fue colapsada eliminando las secuencias redundantes, obteniendo al final secuencias de 19-20 nucleótidos de longitud. El alineamiento fue realizado con el paquete Blast 2.2.28 (Task: blastn-short, cobertura de 18-19 nucleótidos y 100% de homología en sentido 5' a 3').

#### **4.1.4.- Identificación de las secuencias primarias de los miembros de la familia miR-125 (pri-miR-125).**

La anotación del transcriptoma ensamblado de los distintos tejidos y de los tiempos de regeneración de extremidad de *A. mexicanum* fue realizada mediante el paquete Blast 2.2.28 (Blastx, -evaluate 1e-4 -best\_hit\_score\_edge 0.07 -best\_hit\_overhang 0.1 -outfmt 6 -max\_target\_seqs 1.), contra la base de datos de uniprot contra las especies de *H. sapiens* (humano) y *X. tropicalis* (rana africana). Obtenidas las secuencias que dieron hit contra la base de datos, clasificadas como codificantes (cRNAs), fueron separadas de aquellas que no dieron hit, clasificadas como no codificantes (ncRNAs).

Se analizaron las librerías de ncRNAs de tejidos y tiempos de regeneración de extremidad de *A. mexicanum* contra las secuencias maduras putativas a miR-125 (smRNAs) en busca de las secuencias primarias. Se utilizó el paquete Bowtie 1.0.0 (homología del 100%, cobertura de 19 nucleótidos alineados en sentido 5'-3').

#### **4.1.5.- Predicción de precursores de miR-125 (pre-miR-125).**

La predicción de las secuencias precursoras putativas de miR-125 fue realizada mediante un análisis de homología con el paquete Blast 2.2.28 (blastn, -evaluate 1e-4 -best\_hit\_score\_edge 0.07 -best\_hit\_overhang 0.1 -outfmt 6 -max\_target\_seqs 5, alineados en sentido 5'-3'), alineando las secuencias putativas primarias de miR-125a y miR-125b contra la base de datos de secuencias precursoras de miRbase 21 (stem-loop database). Las secuencias fueron flanqueadas de acuerdo a los alineamientos obtenidos. Flanqueadas las secuencias se realizó una predicción de la estructura secundaria con el paquete viennaRNA 1.6, (parámetros default).

#### **4.2.- ANALISIS *IN SILICO* DEL PERFIL DE EXPRESION DE miR-125 EN *A. mexicanum*.**

##### **4.2.1.- Análisis de expresión de miR-125a y miR-125b por tejido.**

Mediante el sistema de gestión de bases de datos “mysql versión 5.5” se estimó la abundancia relativa, identificando la cantidad de cuentas anotadas por librería de tejidos de smRNAs. Generado el análisis de abundancia relativa por tejido se generó el perfil de expresión por tejido (CPM) mediante el paquete de R 3.0.1 “EdgeR”.

##### **4.2.2.- Análisis de expresión de pri-miR-125a pri-miR-125b por tejido y durante regeneración de extremidad.**

La abundancia relativa se estimó con el programa Trinity 2.0.6. (align\_and\_estimate\_abundance.pl), identificando la cantidad de cuentas anotadas por librería de mRNAs.

Generado el análisis de abundancia relativa por tejido y tiempos de regeneración, se generó el perfil de expresión por tejido (CPM) y tiempo de regeneración (Fold change) mediante el paquete de R base 3.1, "EdgeR".

### **4.3.- PREDICCIÓN DE BLANCOS PUTATIVOS DE miR-125 EN *A. mexicanum*.**

#### **4.3.1.- Predicción de blancos putativos**

Se realizó un análisis las librerías de cRNAs de tejido y tiempo de regeneración de extremidad en busca de los blancos putativos globales de miR-125a y miR-125b mediante el uso de TargetScan 60, utilizando los 3' UTR de los cRNAs. Obtenidos los blancos putativos predichos por Targetscan 60, se extrajeron las secuencias identificadas como blancos putativos globales y se procedió a identificar los blancos putativos específicos de miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* con el programa miRanda v3.3a. Posteriormente se realizó la comparación de los blancos putativos de de miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* contra los blancos conservados de miR-125a y miR-125b de la base de datos de targetScan 7.0. Obtenidos los blancos putativos se generó un análisis de enriquecimiento de blancos de las librerías de tejidos, observando la agrupación de los tejidos de acuerdo a la cantidad de blancos y su nivel de expresión en cada tejido mediante el paquete de R base 3.1, "EdgeR".

#### **4.3.2.- Análisis de ontología**

Mediante el programa panther.db se generó un análisis la ontología de los blancos putativos de miR-125 de tejidos y tiempos de regeneración de extremidad. Se extrajeron los blancos involucrados en las categorías GO, nivel 3: proliferación celular, metabolismo primario, regulación de procesos biológicos, procesos de morfogénesis, componentes del movimiento celular, citocinesis, ciclo celular y proliferación celular y se analizó el perfil de expresión de los blancos anotados en las clasificaciones mencionadas calculando su nivel de expresión (fold change) mediante la siguiente ecuación:

$$Fold\ change_{blancos\ putativos\ de\ miR-125a/b} = \left( \frac{CPM_{tiempo\ de\ regeneración\ analizado}}{CPM_{tiempo\ control}} \right)$$

Fueron extraídos los genes blanco que forman parte de las rutas de señalización de Wnt-β catenina, Notch, FGF y AR así como los clasificados por categoría GO como reguladores negativos de células madre.

### **4.4.- ANALISIS DEL PERFIL DE EXPRESION DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA miR-125**

#### **4.4.1.- Amputación de extremidad anterior y extracción de RNA**

Se seleccionaron 12 especímenes de *A. mexicanum* con una longitud entre 15 cm de hocico-cola. Se anestesiaron durante 10 minutos con Benzocaína a una concentración de 2 mg/L. Se amputaron a la altura del zeugópodo, en los distintos tiempos establecidos tabla 2.

**Tabla 2.-** Organismos designados por tiempo de regeneración.

Número de especímenes	Tiempo post- amputación
3	0 h
3	3 d
3	5 d
3	21 d

La extracción de RNA fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo de Trizol, obteniendo de 0.5-1.2 µg de RNA total por mg de tejido.

#### 4.4.2.- qRT-PCR

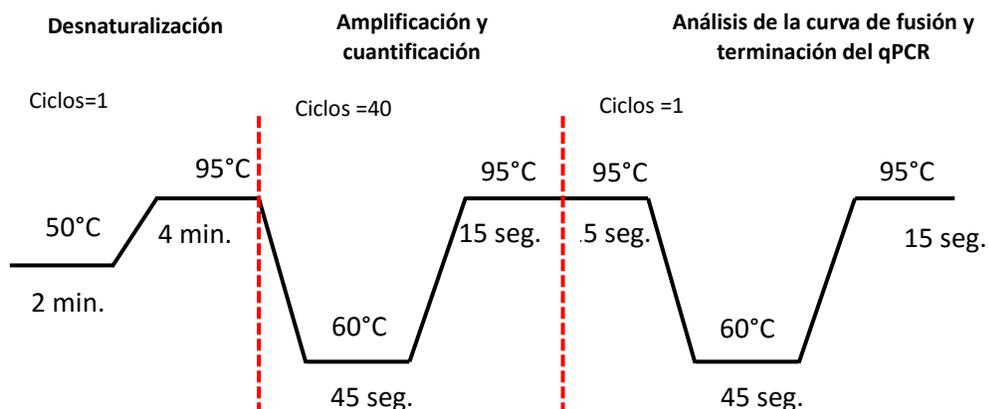
Obtenido el RNA total se realizó la preparación de la muestra para la cuantificación de miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* partiendo de una concentración inicial de 1.2 µg de RNA total. Se realizó una reacción de poliadenilación del RNA total con el fin de llevar los miRNAs maduros a una longitud que permitiera su retro-transcripción y cuantificación; poliadenilados los miRNAs se realizó la retrotranscripción del RNA, generando cDNA. El qPCR fue realizado utilizando el reactivo Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG y un termociclador para tiempo real StepOne™ System. Los pasos descritos fueron realizados de acuerdo al protocolo de NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis.

Los tiempos y temperaturas utilizadas durante el qPCR se muestran en la Figura 14, así como las secuencias de primers utilizadas son mostradas en la tabla 3.

**Tabla 3.-** Lista de primers utilizados para qPCR.

Nombre	Secuencia
miR-125a	TCCCTGAGACCCTTAACCTGUG
miR-125b	TCCCTGAGACCCTAACTTGTA
snoR-135	TAGCTGGAATTACCGGCAGAT
Universal qPCR-primer	NA*

\* primer provisto por kit NCODE. (secuencia no disponible)



**Figura 14.-** Ciclos y temperaturas utilizadas para el qPCR de miR-125a y miR-125b durante regeneración de extremidad de *A. mexicanum*.

El cálculo de fold-change se realizó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta CT_{\text{tiempo de regeneración}} = CT_{\text{miR-125a/b}} - CT_{\text{snoR-135}}$$

$$\Delta\Delta CT_{\text{tiempo post-amputación}} = \Delta CT_{\text{tiempo de regeneración analizado}} - \Delta CT_{\text{tiempo de regeneración de referencia}}$$

$$\text{Fold change}_{\text{tiempo post-amputación}} = 2^{(-\Delta\Delta CT_{\text{tiempo post-amputación}})}$$

## V.-RESULTADOS

### 5.1.- Procesamiento y anotación de librerías.

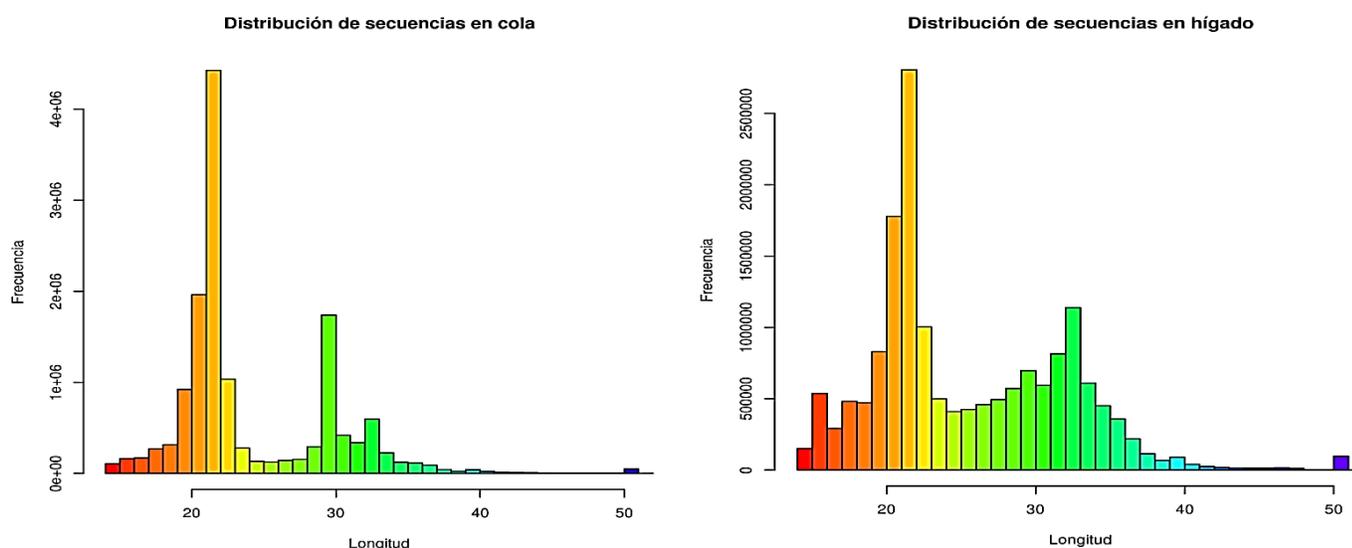
#### 5.1.1.- RNAs pequeños (smRNAs).

Se obtuvieron las siguientes características de las librerías de smRNAs de tejidos (tabla 4).

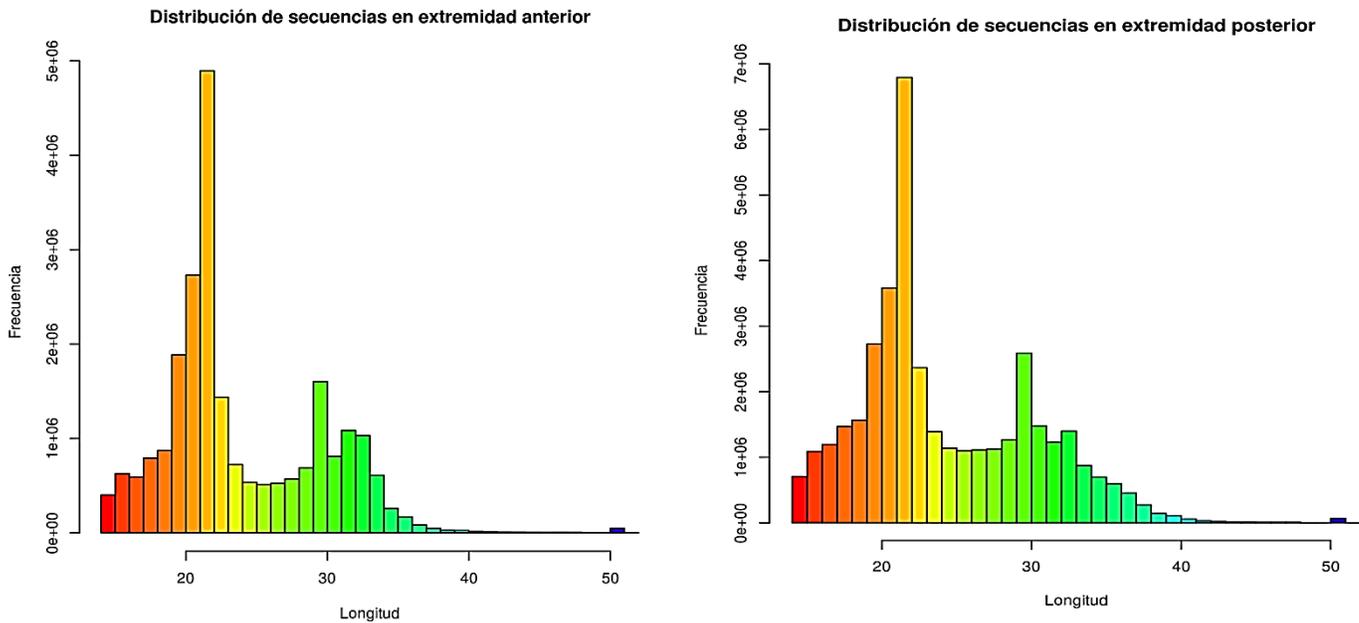
**Tabla 4.-** Datos obtenidos de las librerías de *A. mexicanum* (smRNA), pre y post procesadas.

Tejido	Fragmentos por librerías		
	Datos crudos	Datos procesados	% de remoción
Hígado	21521750	16614518	22.80
Cola	16505286	14365033	12.97
Extremidad posterior	42955452	38693807	9.97
Extremidad anterior	26298923	23644820	10.09

La mayoría de las lecturas obtenidas están dentro de un rango de frecuencia de 20-23 nucleótidos correspondiente a la longitud descrita en bibliografía para los miRNAs, quedando otro pico en un rango de 30-33 nucleótidos, presumiblemente correspondientes a piwiRNAs (piRNAs) (Figura 15 y 16).



**Figura 15.-** Distribución de secuencias por longitud y tejido (cola e hígado) en las librerías de smRNAs después de la eliminación de adaptadores y secuencias de baja calidad.



**Figura 16.-** Distribución de secuencias por longitud y tejido (extremidad anterior y posterior) en las librerías de smRNAs después de la eliminación de adaptadores y secuencias de baja calidad.

La cantidad de miRNAs 100% conservados por librería de tejido analizado se pueden observar en la tabla 5, en total se encontraron 621 miRNAs conservados en *A. mexicanum*, la lista de miRNAs se encuentra disponible en el **Anexo C**.

**Tabla 5.-** miRNAs 100% conservados por tejido en *A. mexicanum* con al menos 1 copia anotada.

miRNAs	Tejido
460	Hígado
487	Cola
522	Extremidad anterior
530	Extremidad posterior

### 5.1.2.- RNAs mensajeros (mRNAs)

Se obtuvieron las siguientes características de las librerías de mRNAs de los distintos tiempos de regeneración de extremidad (tabla 6).

Las cantidad de secuencias anotadas contra la base de datos de uniprot (*H. sapiens* y *X. tropicallis*) para las librerías de tejidos se muestra en la tabla 7, obteniendo 36.8% del total de secuencias anotadas (cRNAs) y 63.22% de secuencias no anotadas (ncRNAs). El porcentaje de anotación de librerías de tiempos de regeneración de extremidad se encuentra en la tabla 8, obteniendo 37.14% de secuencias anotadas como cRNAs y 62.85% como ncRNAs.

**Tabla 6.-** Datos obtenidos de las librerías de *A. mexicanum* (mRNA-seq), pre y post procesadas.

Tiempo de regeneración	Fragmentos por librerías		% de remoción
	Datos crudos	Datos procesados	
0 horas	16974066	12653977	25.45
3 horas	18631612	15507496	16.77
6 horas	18865464	16369582	13.23
12 horas	19355559	16070988	16.97
1 día	19275194	16661890	13.56
3 días	19450380	16540516	14.96
5 días	18682600	14342385	23.24
7 días	16560123	12617474	23.81
10 días	6745177	4949073	26.63
14 días	18347021	15014379	18.16
21 días	18794185	16281769	13.37
28 días	18346920	15557587	15.20

**Tabla 7.-** Porcentaje de anotación de transcriptoma de tejidos.

Anotación (secuencias)	Base de datos	Porcentaje (%)
13554	<i>H. sapiens</i>	19.14
12506	<i>X. tropicallis</i>	17.66
44772	No codificantes (nc)**	63.22

\*\* Algunas secuencias presentan OFR, que pueden corresponder a proteínas no descritas en la base de datos de uniprot (*H. sapiens* y *X. tropicallis*).

**Tabla 8.-** Porcentaje de anotación de transcriptoma de tiempos de regeneración.

Anotación (secuencias)	Base de datos	Porcentaje (%)
22787	<i>H. sapiens</i>	19.66
20261	<i>X. tropicallis</i>	17.48
72829	No codificantes (nc)**	62.85

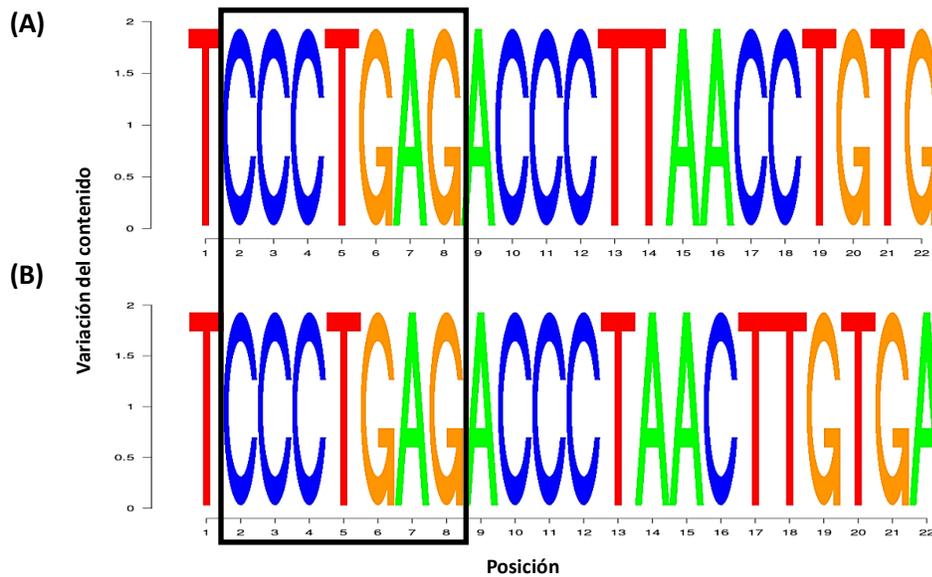
\*\* Algunas secuencias presentan OFR, que pueden corresponder a proteínas no descritas en la base de datos de uniprot (*H. sapiens* y *X. tropicallis*).

## 5.2.- Identificación *in silico* de la familia miR-125.

Se identificaron 2 miRNAs putativos a miR-125 en la librería de smRNAs, los cuales fueron clasificados como miR-125a y miR-125b, en base a su homología contra la base de datos de miRbase 21 (Figura 17), en la cual se encuentran descritas 4 secuencias correspondientes a miR-125 (**Anexo D**). Se pudo observar la homología del 100% en la región semilla entre ambas secuencias.

Las secuencias primarias fueron identificadas en las librerías de ncRNAs, en las cuales fueron alineadas 3 secuencias putativas a pri-miR-125, los cuales presentan longitud >1 kb, correspondiente a lo descrito en antecedentes.

Se identificó una secuencia correspondiente a miR-124a y dos secuencias correspondientes a miR-125b, las cuales fueron denominadas pri-miR-125a, pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2 (tabla 9).



**Figura 17.-** Se muestran la secuencia correspondiente a miR-125a y miR-125b presentes en librerías de smRNAs de *A. mexicanum*, (A) miR-125a en su forma madura presenta 100% de homología con 9 especies, (B) miR-125b en su forma madura presenta 100% de homología con 36 especies, los alineamientos se encuentran disponibles en el **Anexo D**. En el recuadro negro se muestra la región semilla esencial para el reconocimiento de sus genes blancos, la cual está 100% conservada entre ambos miRNAs.

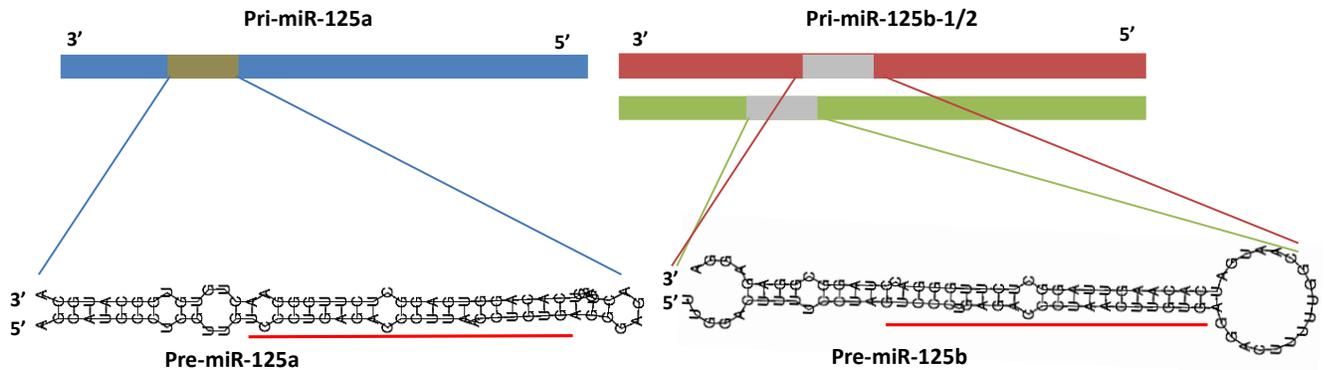
**Tabla 9.-** Putativos pri-miR-125a, pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2 identificados en transcriptoma de ncRNAs. nt= nucleótidos.

Secuencia	Longitud (nt)
pri-miR-125a	1456
pri-miR-125b-1	3227
pri-miR-125b-2	3737

### 5.2.1.- Identificación de precursores de miR-125.

Se obtuvieron dos secuencias putativas a pre-miR-125a y pre-miR-125b a partir de las secuencias primarias de pri-miR-125a, pri-miR-125b1 y pri-miR-125b-2. Las secuencias primarias fueron flanqueadas en base al porcentaje de homología presentado contra los múltiples precursores de miR-125a y miR-125b reportados en la base de datos de miRbase 21 (stem-loop database). Las secuencias alineadas con mayor homología fueron miR-125a de *D. rerio* y miR-125b de *X. tropicalis* contra miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* respectivamente (**Anexo E**). La secuencia del precursor de miR-125b es 100% idéntica en ambas secuencias primarias (pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2).

Al realizar el análisis de la estructura secundaria a las secuencias flanqueadas se obtuvo una conformación de tallo-asa. Esta estructura es necesaria para el reconocimiento y edición por DICER durante el proceso de biogénesis. La secuencia madura es situada dentro de la estructura de tallo (Figura 18). El miRNA maduro es reconocido por la proteína AGO y servirá como guía contra sus secuencias blanco, como es descrito en antecedentes.



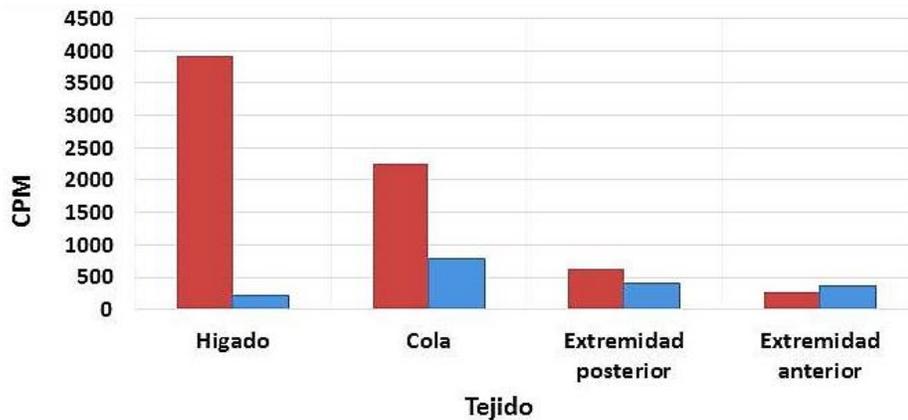
**Figura 18.-** Predicción de pre-miR-125a (café) y pre-miR-125b (gris) a partir de los putativos pri-miR-125a (azul), pri-miR-125b-1 (rojo) y pri-miR-125b-2 (verde) respectivamente, pre-miR-125b es 100% idéntico en ambos pri-miR-125b variando únicamente en la ubicación dentro de cada secuencia primaria, la predicción de la estructura secundaria presenta la típica estructura de tallo-asa necesaria para el reconocimiento por DICER, la línea roja representa la secuencia madura de miR-125a y miR-125b.

### 5.3.- Análisis *in silico* del patrón de expresión de la familia miR-125 (maduro y primarios).

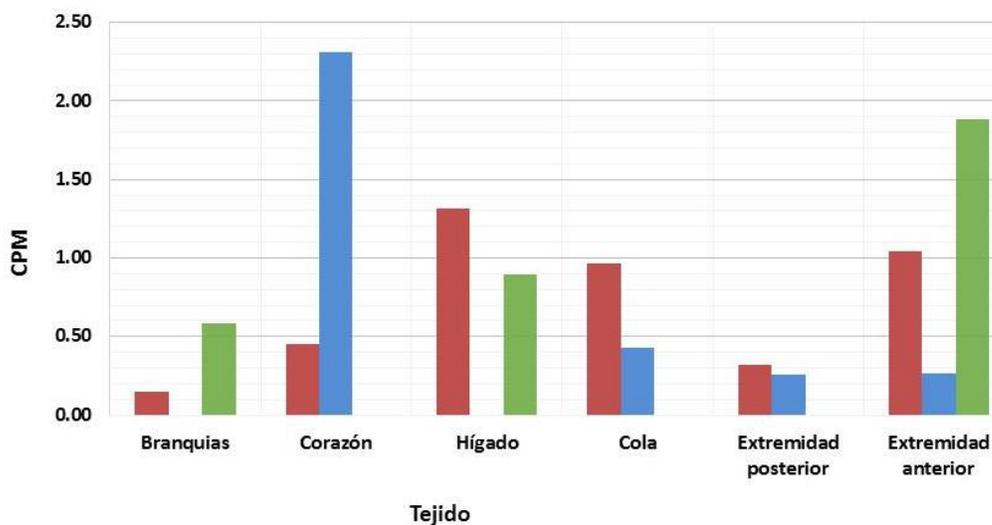
#### 5.3.1.- Expresión de miR-125a/b y pri-miR-125a/b (CPM) en los distintos tejidos de *A. mexicanum*.

El análisis de expresión de ambos miR-125 muestra una gran variación respecto al nivel de miR-125a y miR-125b en los tejidos analizados. miR-125a es altamente expresado en hígado (3923 CPM) y cola (2259.72 CPM), en contraste miR-125b se expresa aproximadamente 18 veces menos en hígado (213.47 CPM) y aproximadamente 3 veces menos en cola (787.08 CPM). Sin embargo, en ambas extremidades el perfil de expresión de ambos miRNAs no presenta estas grandes diferencias. En la extremidad posterior la expresión de miR-125a (621.38 CPM) es ligeramente superior a miR-125b (395.32 CPM), mientras en la extremidad anterior es el único tejido en el cual el nivel de expresión de miR-125b (355.96 CPM) es ligeramente superior a miR-125a (270.86 CPM) como se puede apreciar en la Figura 19.

El perfil de expresión de las secuencias primarias de miR-125a y miR-125b de los distintos tejidos de *A. mexicanum* muestran un perfil de expresión demasiado variable en los tejidos analizados. pri-miR-125b-1 presenta alrededor de 0.25 CPM en ambas extremidades, 0.43 CPM en la cola y 2.31 CPM en el corazón, sin embargo se encuentra ausente en el tejido del hígado y branquias. Mientras que pri-miR-125b-2 presenta 0.58 CPM en las branquias, 0.89 CPM en hígado y 1.89 en la extremidad anterior, mostrándose ausente en corazón, cola y extremidad posterior. Mientras que pri-miR-125a se encuentra presente en todos los tejidos con 0.15 CPM en branquias, 0.46 CPM en corazón, 1.31 CPM en hígado, 0.96 CPM en 0.32 CPM en extremidad posterior y 1.05 CPM en la extremidad anterior, como se muestra en la Figura 20.



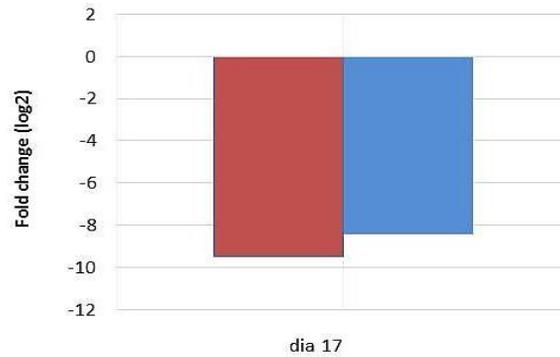
**Figura 19.-** Perfil de expresión de miR-125a y miR-125b en los distintos tejidos analizados de *A. mexicanum*, en el cual se puede apreciar mayor nivel de expresión de miR-125a en hígado, cola y extremidad posterior respecto a miR-125b, sin embargo en la extremidad anterior se puede apreciar ligeramente un mayor nivel de expresión de miR-125b con respecto a miR-125a. Rojo=miR-125a, azul=miR-125b, CPM=Cuentas por millón.



**Figura 20.** Perfil de expresión de miR-125a, miR-125b-1 y miR-125b-2 en los distintos tejidos analizados de *A. mexicanum*, en el cual se puede apreciar la presencia de pri-miR-125a en todos los tejidos analizados, mientras que pri-miR-125b-1 se encuentra ausente en branquias e hígado, así como pri-miR-125b-2 se encuentra ausente en corazón, cola y extremidad posterior. Rojo=miR-125a, azul=miR-125b-1, verde=miR-125b-2, CPM=Cuentas por millón.

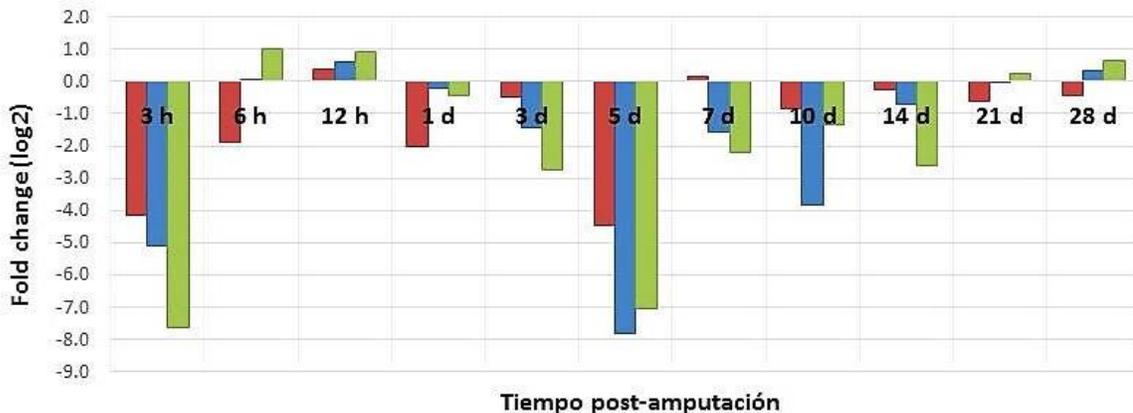
### 5.3.2.- Expresión durante regeneración (fold-change).

Se realizó un análisis de los resultados obtenidos en el estudio por Holman y colaboradores en el 2012. Se logró observar el nivel de expresión de miR-125a/b durante la regeneración de extremidad anterior al día 17 post-amputación. Se puede observar una disminución del nivel de expresión de miR-125a y miR-125b respecto al tiempo 0 (Figura 21).



**Figura 21.**-Perfil de expresión de miR-125a/b al día 17 post-amputación. (datos tomados de Holman *et al.* 2012). n= 3, P < 0.5.

Se identificó el perfil de expresión de pri-miR-125a, miR-125b-1 y miR-125b-2 durante los distintos tiempos de regeneración de extremidad posterior utilizando los datos generados por Steward y colaboradores en el 2013. Se observa que pri-miR-125a, pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2 muestran un perfil de expresión negativo a partir del tiempo de 1 día hasta los 14 días. Pri-miR-125a muestra una expresión positiva en el día 7, la cual difiere del perfil presentado por pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2. El perfil de expresión negativo de pri-miR-125 corresponde a la predicción de la modulación indirecta genes implicados promover las etapas de la regeneración (formación, mantenimiento y proliferación del blastema). En tiempos tardíos de regeneración se observa el incremento en la expresión de los pri-miR-125a, pri-miR-125b1 y pri-miR-125b-2, durante el fenómeno de re-diferenciación (Figura 22).

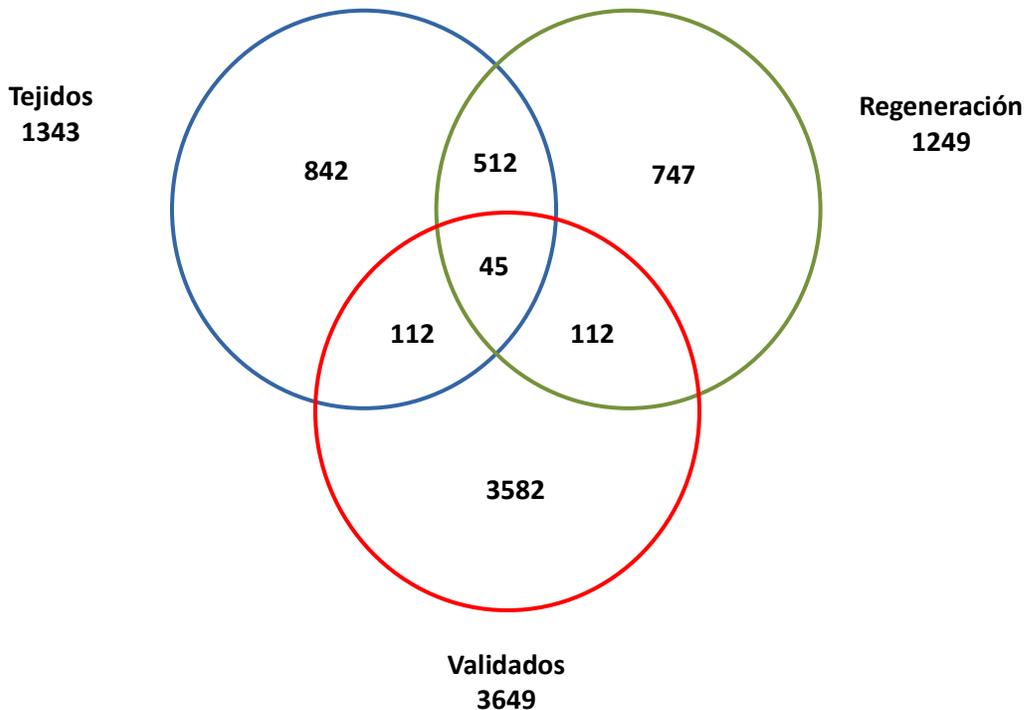


**Figura 22.**-Perfil de expresión de pri-miR-125a/b durante los distintos tiempos de regeneración (0-28 dpa), datos generados por Steward en el 2013, se puede observar como los niveles de expresión bajan en las etapas de formación y mantenimiento del blastema (3-14 días) así como los mismos comienzan a aumentar en etapas tardías correspondientes a la re-diferenciación de la extremidad (21-28 días). Rojo=miR-125a, azul=miR-125b-1, verde=miR-125b-2, dpa= días post-amputación. h= horas, d= días.

#### 5.4.- Predicción *in silico* de blancos putativos de miR-125a/b de *A. mexicanum*.

Se realizó la predicción de blancos putativos de miR-125a/b de *A. mexicanum* con los 3' UTRs de los RNAs codificantes. Obteniendo un total de 1343 blancos putativos para miR-125a/b en los distintos tejidos y un total de 1249 blancos putativos para miR-125a/b durante los distintos tiempos de

regeneración de extremidad. miR-125a y miR-125b poseen los mismos blancos dentro de ambas librerías debido a una alta homología de su secuencia. La diferencia entre ambos es el nivel afinidad hacia los blancos (score). Ya que la familia miR-125 se encuentra altamente conservada entre múltiples especies, se realizó un análisis de conservación de blancos contra la base de datos de TargetScan con 3582 blancos identificados y validados para miR-125a/b. Se obtuvieron 112 blancos conservados entre miR-125a/b de *A. mexicanum* y 18 especies. Se identificaron los blancos presentes únicamente en los distintos tejidos y durante los tiempos de regeneración. De los cuales se obtuvieron 842 blancos únicos en tejido y 747 blancos únicos durante la regeneración, con 512 blancos compartidos entre ambas librerías y 47 blancos validados y compartidos en ambas librerías Figura 23. Los blancos predichos se encuentran disponibles en el **Anexo F**.

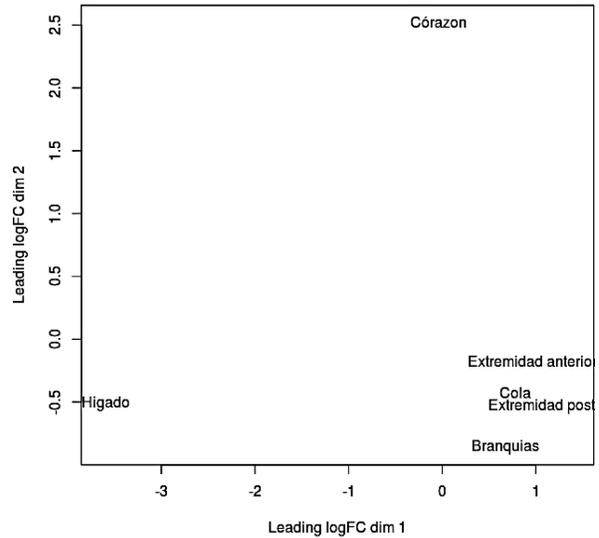


**Figura 23.-** Blancos predichos para miR-125a/b de *A. mexicanum* en los distintos tejidos y durante la regeneración de extremidad así como su comparación contra los blancos conservados entre múltiples especies, se pueden observar los blancos únicos de cada librería y los blancos en común entre ambas librerías.

El enriquecimiento de blancos putativos por tejido muestra una menor cantidad de blancos en hígado y corazón, respecto a los demás tejidos como se muestra en la tabla 10; el agrupamiento de los tejidos en base a la cantidad y nivel de expresión de blancos muestra mayor similitud en los blancos corazón expresados en las extremidades, branquias y cola, mostrando una mayor variabilidad en hígado (Figura 24).

**Tabla 10.-** Enriquecimiento de blancos putativos por tejido de *A. mexicanum* así como los blancos únicos de cada tejido

Tejido	Número de blancos putativos
Hígado	1171
Corazón	1238
Branquias	1278
Cola	1280
Extremidad anterior	1283
Extremidad posterior	1284

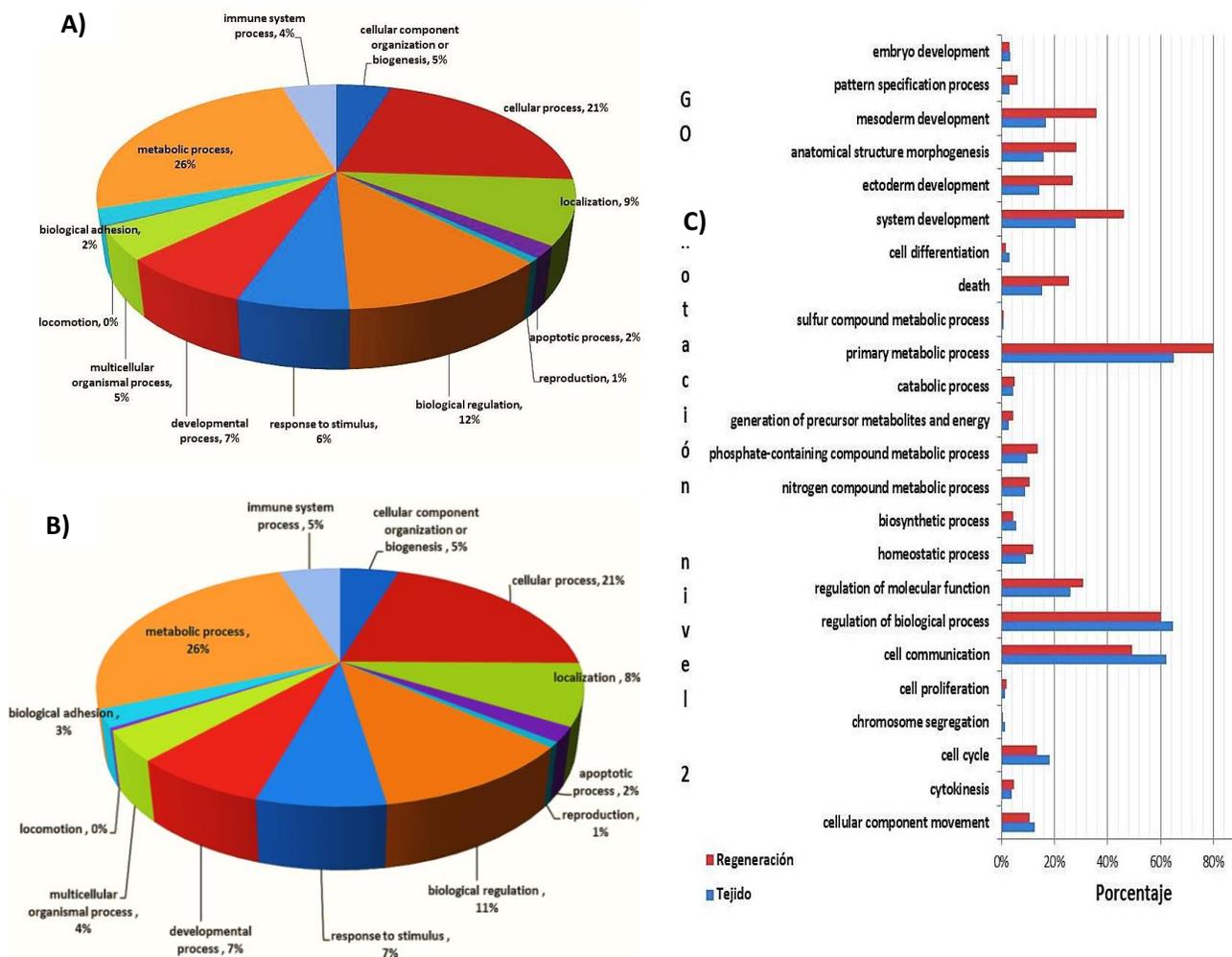


**Figura 24.-** Se puede observar el agrupamiento de los tejidos en base a la cantidad y nivel de expresión de los blancos predichos, dentro de los cuales destacan hígado con una cantidad menor de blancos y el corazón, con cantidad de blancos similar a cola, branquias, extremidad anterior y posterior, pero con un nivel de expresión de sus blancos mayor.

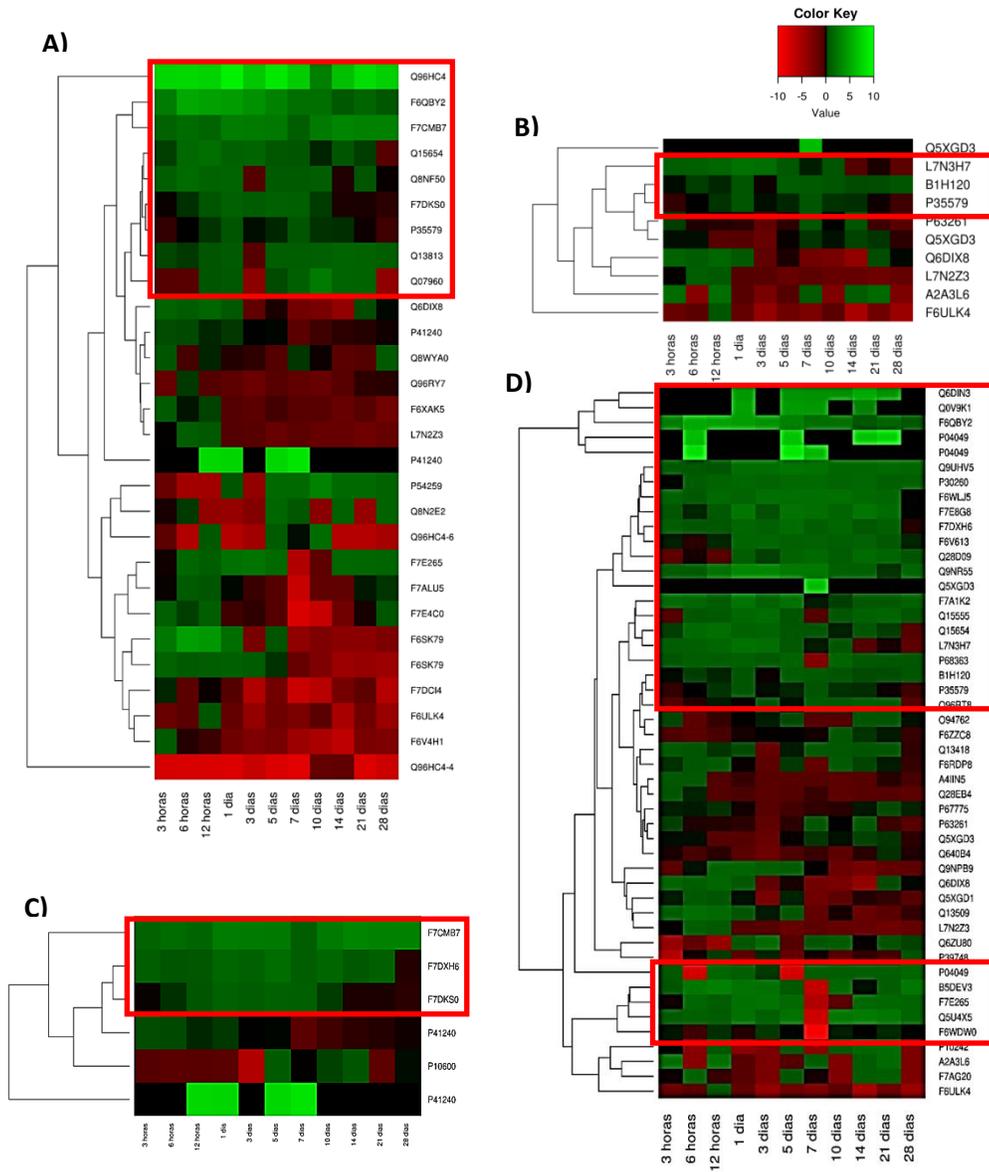
### 5.5.- Análisis de ontología (GO) de los blancos putativos de miR-125 de *A. mexicanum*.

Obtenidos los blancos putativos de miR-125a/b de *A. mexicanum* se realizó un análisis de ontología en busca de identificar los procesos biológicos en los cuales estaban categorizados los blancos predichos. Se obtuvieron 13 anotaciones (GO nivel 1) contra la base de datos de pantherDB para los blancos de la librería de tejidos así como 13 anotaciones (GO nivel 1) para los blancos dentro de la categoría procesos biológicos (Figura 25A y 25B).

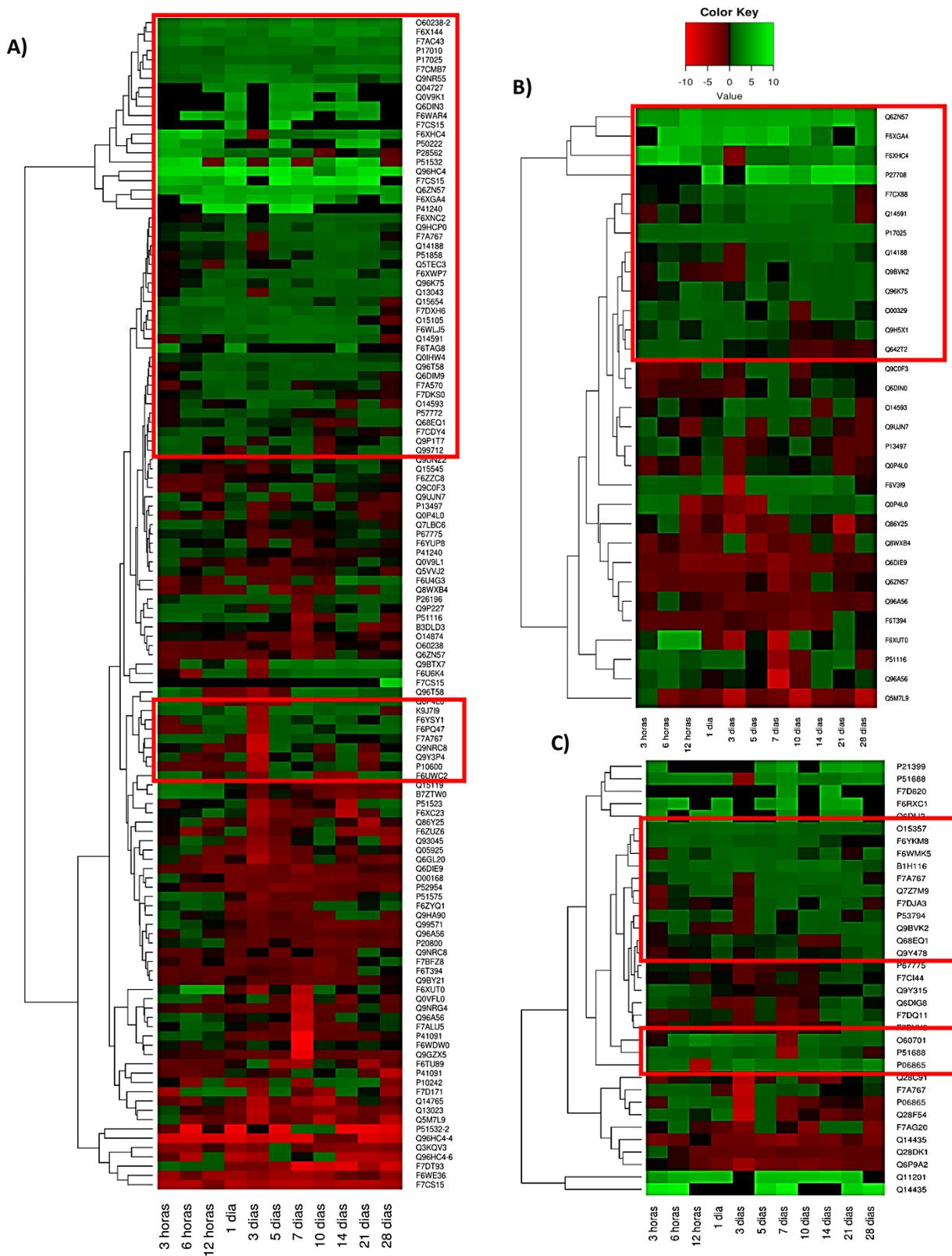
Se extrajeron los blancos anotados dentro de las clasificaciones GO nivel 2 (Figura 25C) y nivel 3: procesos celulares (componentes del movimiento celular, citocinesis, ciclo celular y proliferación celular, Figura 26), regulación biológica (regulación de procesos biológicos, Figura 27A), procesos metabólicos (procesos de biosíntesis y metabolismo de carbohidratos ver figura 27B y 27C) y procesos de desarrollo (proliferación celular, morfogénesis de estructuras anatómicas) Figura 28, observando el patrón de expresión de los genes blanco, en el cual se puede observar aquellos genes que sufren sobre-regulación durante los tiempos de regeneración de extremidad involucrados en las categorías mencionadas.



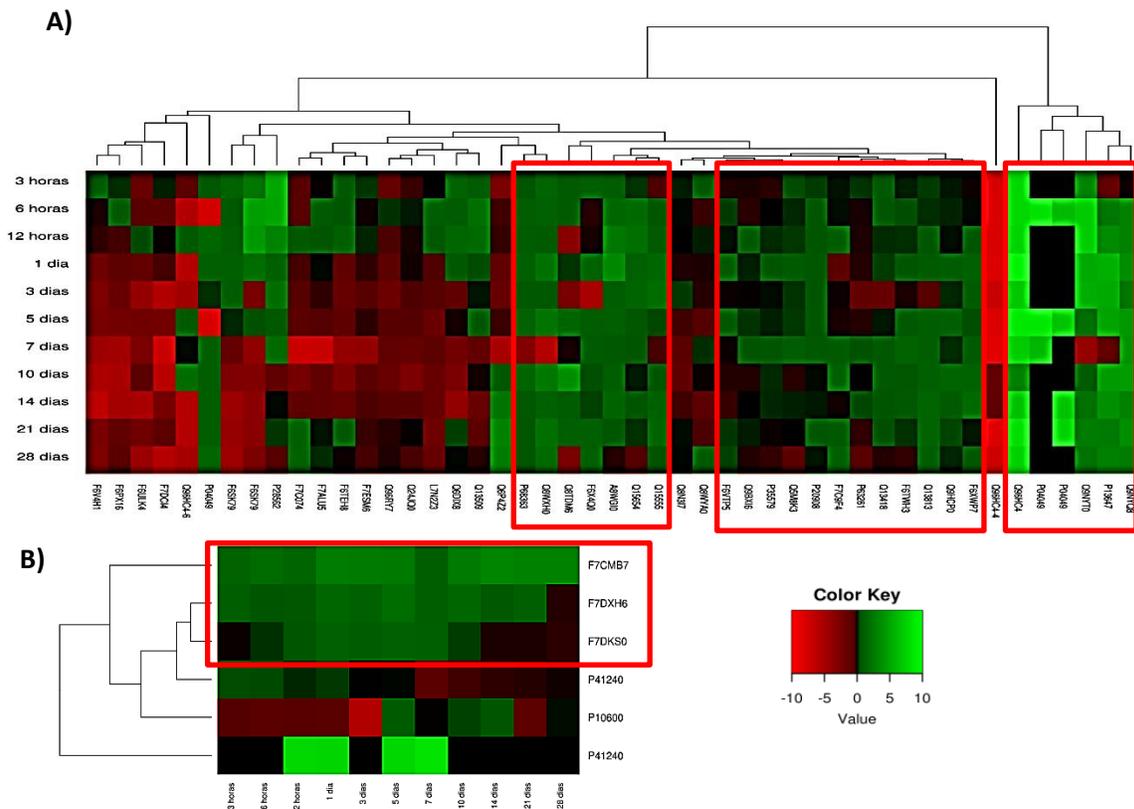
**Figura 25.-** Ontología de genes (GO) nivel 1 ( $p < 0.05$ ) para: (A) los blancos predichos de miR-125a/b en tejido, (B) blancos predichos de miR-125a/b durante regeneración, (C) se puede observar la diferencia entre el porcentaje de anotación de las categorías GO nivel 2 ( $p < 0.05$ ): procesos celulares (GO:0009987), regulación biológica (GO:0065007), procesos metabólicos (GO:0008152) y procesos de desarrollo (GO:0032502) entre los blancos predichos de miR-125a/b de tejido y durante regeneración de extremidad de *A. mexicanum*.



**Figura 26.-** Perfil de expresión de los genes blanco anotados dentro de las categorías GO nivel 3: (A) componentes del movimiento celular, (B) citocinesis, (C) ciclo celular y (D) proliferación celular; puede ser apreciados aquellos blancos que son sobre-regulados durante los distintos tiempos de regeneración (cuadros rojos).  $P < 0.05$ .



**Figura 27.-** Perfil de expresión de los genes blanco anotados dentro de las categorías GO nivel 3: (A) regulación de procesos biológicos, (B) procesos de biosíntesis, (C) metabolismo de carbohidratos; puede ser apreciados aquellos blancos que son sobre-regulados durante los distintos tiempos de regeneración (cuadros rojos).  $P < 0.05$



**Figura 28.-** Perfil de expresión de los genes blanco anotados dentro de las categorías GO nivel 3: (A) proliferación celular, (B) morfogénesis de estructuras anatómicas; puede ser apreciados aquellos blancos que son sobre-regulados durante los distintos tiempos de regeneración (cuadros rojos).  $P < 0.05$ .

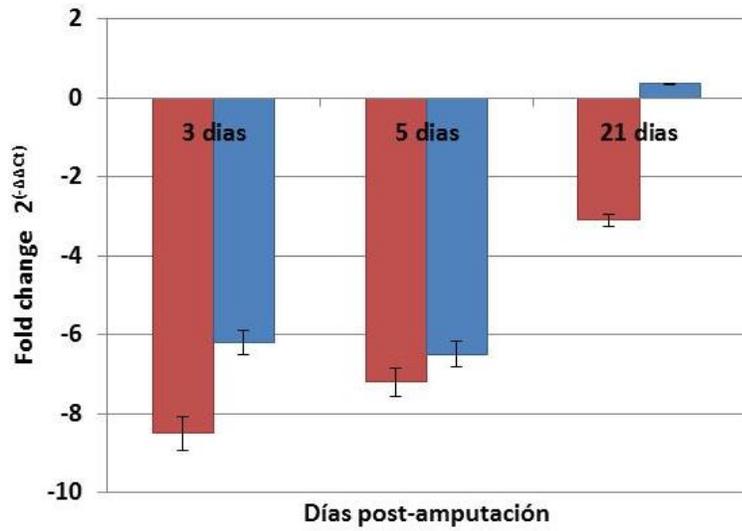
Los genes encontrados que participan en las rutas de Wnt- $\beta$  catenina, Notch, FGF y AR, fueron los siguientes, así como aquellos blancos clasificados como reguladores negativos de la diferenciación de células madre:

Vía de señalización FGF		Vía de señalización RA		Vía de señalización Notch	
<b>Genes blanco</b>	CLEC16A		PDGFRB	<b>Genes blanco</b>	LNX1
	PIK3CD		TFRC		LFNG
	RAF1	<b>Genes blanco</b>	DUSP1		
	RRAS2		FZD10		
	PPP2CA		EPHA3		
	PPP2R1A				
	MAP3K6				
	RAC2				
	RPAP1				
	RAC1				

Vía de señalización Wnt-βcatenina		Regulación negativa de diferenciación de células madre	
	UGDH		SMAD7
	SMARCA4	<b>Genes blanco</b>	PPP2CA
	CDH6		ZFP36L2
	ARID1B		F2R
	EN1		
	CSNK1G1		
	CDH2		
<b>Genes blanco</b>	PPP2CA		
	TNF		
	CSNK2A2		
	TLE4		
	PCDHGC5		
	GNG7		
	FZD10		
	FAT2		
	AXIN1		
	FZD10		
	CDH5		
	MYH3		
	UGDH2		

### 5.6.- Perfil de expresión de miR-125 durante regeneración de extremidad posterior de *A. mexicanum*.

Se realizó un análisis del perfil de expresión de ambos miembros de la familia miR-125 de *A. mexicanum* mediante qRT-PCR (Figura 29). Se observa la disminución del nivel de expresión de miR-125a y miR-125b a los 5 y 7 días post amputación, así como un incremento de ambos miRNAs al día 21 post-amputación, respecto al tiempo 0. Sin embargo, la regulación de miR-125a se muestra regulado negativamente, mientras que miR-125b sufre una ligera sobre-expresión en dicho tiempo de regeneración como se muestra en la Figura 29.

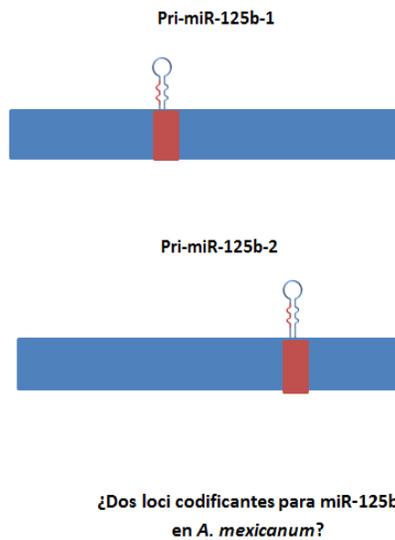


**Figura 29.-** Perfil de expresión de miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* durante regeneración de extremidad (qRT-PCR), en el cual se puede observar la regulación negativa de ambos miRNAs durante los tiempos de formación y proliferación del blastema, así como su incremento en etapas tardías correspondientes a la maduración y diferenciación del blastema.

## VI.-DISCUSIÓN

La familia miR-125 se encuentra ampliamente distribuida entre la mayoría de los organismos vertebrados e incluso en algunos organismos invertebrados. El papel fundamental de la familia miR-125 ha sido bien caracterizado en múltiples líneas celulares, como un miRNA clave para el mantenimiento y promoción de la diferenciación y proliferación celular (Sun *et al.* 2013). En este estudio se logró identificar dos miembros de la familia miR-125 en *A. mexicanum*, miR-125a y miR-125b, provenientes de 3 secuencias primarias (pri-miR-125a, pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2). El perfil de expresión de las secuencias primarias en los tejidos analizados presenta una variación notoria, incluso la ausencia de pri-miR-125b-1 y prim-miR-125b-2 en algunos tejidos. Esto sugiere que la expresión de pri-miR-125b son tejido específico y existe la posible presencia de al menos dos loci dentro del genoma de *A. mexicanum* que codifican para miR-125b. En múltiples especies de vertebrados se han encontrado 2 secuencias correspondientes a miR-125b, codificadas en 2 cromosomas distintos como puede verse en la Figura 30 (datos tomados de NCBI y Xenbase, 2015). Sin embargo, debido a que el genoma de *A. mexicanum* aún no ha sido secuenciado, no es posible confirmar la existencia de dos loci codificantes para pri-miR-125b a través de herramientas bioinformáticas. Una opción para comprobar esta teoría sería la clonación de las secuencias a partir de DNA genómico lo que permitiría validar la existencia de ambas secuencias y la presencia de dos loci codificantes para miR-125b en *A. mexicanum*.

Especie	miRNA	Localización genómica
Humano	miR-125b-1	Chr. 11
	miR-125b-2	Chr. 21
Ratón	miR-125b-1	Chr. 9
	miR-125b-2	Chr. 16
Rata	miR-125b-1	Chr. 8
	miR-125b-2	Chr. 11
Toro	miR-125b-1	Chr. 15
	miR-125b-2	Chr. 1
Pez cebra	miR-125b-1	Chr. 15
	miR-125b-2	Chr. 5
	miR-125b-3	Chr. 10
Rana	miR-125b-1	Chr. 7
	miR-125b-2	Chr. 2
Ajolote	miR-125b-1	?
	miR-125b-2	?



**Figura 30.-** Ubicación de miR-125b-1 y miR-125b-2 en el genoma de múltiples especies de vertebrados. La presencia de 2 secuencias putativas de pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2 en *A. mexicanum* genera la posibilidad de la existencia de 2 loci codificantes para dichas secuencias. (Datos tomados de la base de datos NCBI y Xenbase el 28 de agosto del 2015).

Las secuencias maduras encontradas (miR-125a y miR-125b) presentan una homología del 100% contra múltiples especies de vertebrados y un perfil de expresión altamente variable en los tejidos analizados. miR-125b fue descrito por primera vez por Quiroz y colaboradores, como un miRNA necesario para la regeneración de cola (Quiroz *et al.*, 2014).

En el estudio realizado por Quiroz y colaboradores miR-125b regula a SEMA4D, permitiendo la correcta regeneración de la cola. miR-125b demostró una alta expresión durante el tiempo cero en las células gliales alrededor de la médula espinal y una expresión negativa al día 1 y 7 post-amputación. Por el contrario miR-125a, no ha sido descrita anteriormente en *A. mexicanum*, este miRNA presenta una expresión tres veces mayor en cola y un mayor score de unión al sitio blanco de SEMA4D como se muestra en la Figura 31, lo cual implicaría una mayor regulación de SEMA4D por miR-125a.

Blanco	miRNA	Score	Energía de unión (KCal/Mol)
SEMA4	miR-125a	151	-17.60
	miR-125b	147	-19.83



**Figura 31.-** Se muestra la predicción de unión de miR-125a y miR-125b al sitio 3' UTR de SEMA4D de *A. mexicanum*, en el cual miR-125a muestra mayor score de unión a SEMA4D respecto a miR-125b. La abundancia de miR-125a en cola de *A. mexicanum* es aproximadamente 3 veces mayor respecto a miR-125b, lo cual implicaría una mayor regulación de SEMA4D por miR-125a.

Los blancos putativos predichos para ambos miRNAs fueron los mismos en todos los tejidos analizados, presentando variación únicamente en el nivel de especificidad (unión miRNA-Blanco por complementariedad). Dicho lo anterior se puede deducir que el nivel de regulación de los blancos se verá afectado directamente por la cantidad presente de los miRNAs y su especificidad de unión al blanco, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Total Score}_{\text{Nivel de regulación}} = \log[(\text{Especificidad de unión})(\text{cantidad de miRNA})]$$

Por ejemplo, en el caso de SEMA4D en cola de *A. mexicanum*:

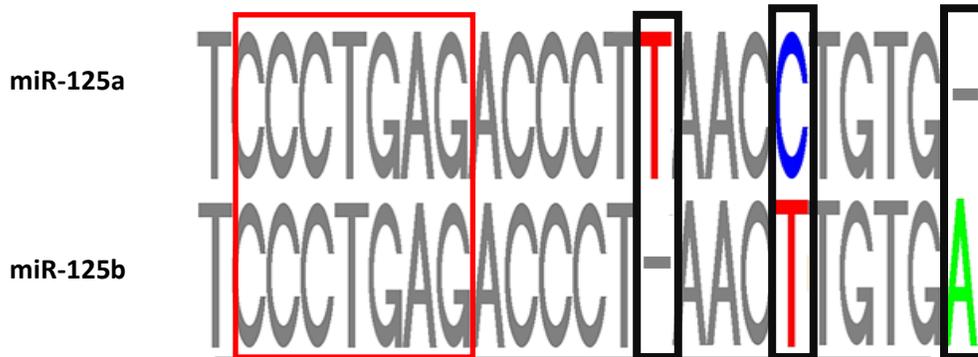
Blanco	miRNA	Score	CPM	Total Score
SEMA4	miR-125a	151	2259.72	5.53
	miR-125b	147	787.08	5.06

Esto implicaría una mayor eficiencia en la regulación para aquellos miRNAs con mayor abundancia y especificidad hacia su secuencia blanco. Lo cual genera las siguientes preguntas sobre miR-125a durante la regeneración de cola de *A. mexicanum*:

- ¿La expresión de miR-125a es en las células gliales o en otro tejido de la cola?
- Si miR-125a se expresará en tejido distinto a las células gliales en cola de *A. mexicanum* ¿cuál es el papel de miR-125a durante la regeneración de cola en *A. mexicanum*?
- Múltiples genes son expresados en tejidos específicos, ¿Cuáles son los blancos que está regulando durante este proceso?

La similitud entre ambos miRNAs es muy elevada (la diferencia entre miR-125a y miR-125b es únicamente de 3 nucleótidos) como se puede apreciar en la Figura 32. Esta similitud implica un reto al

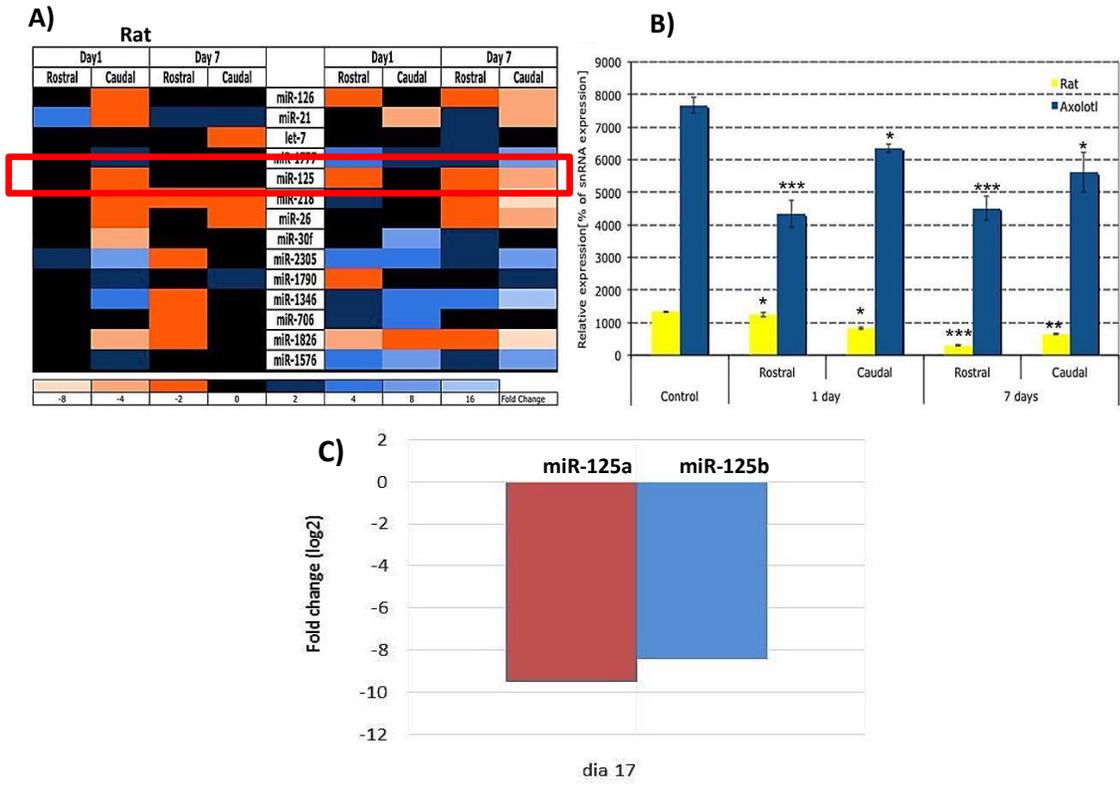
realizar análisis de pérdida de función. Para poder observar el efecto específico de cada uno de estos miRNAs se necesitan inhibidores altamente específicos, capaces de discriminar entre estos pequeños cambios. Esto permitiría observar la implicación de miR-125a y miR-125b durante la regeneración. Sin embargo la tecnología utilizada para este tipo de análisis (mimiCRY) no presenta esta especificidad.



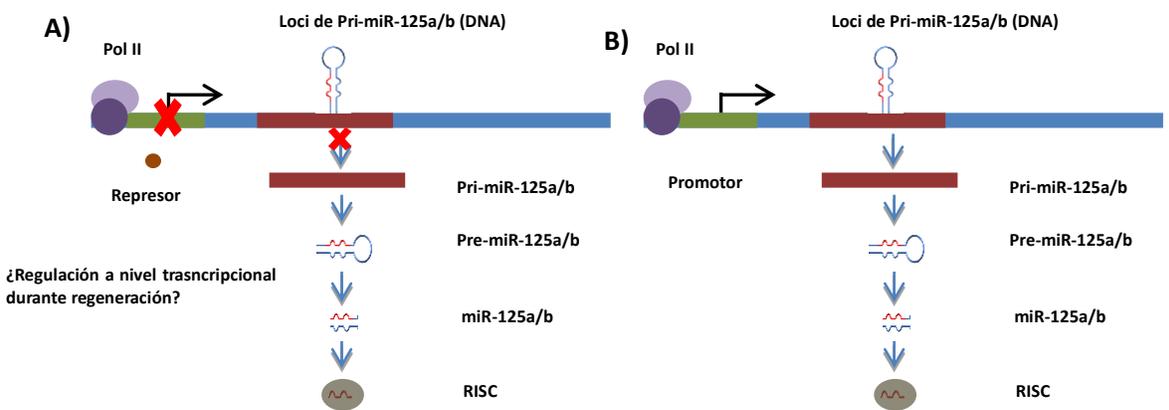
**Figura 32.-** Se muestra las diferencias de miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum*, la cual es de 3 nucleótidos, esta diferencia mínima entre ambas secuencias implica que estas tengan los mismos blancos variando únicamente en la especificidad de unión.

Durante el análisis de expresión por qPCR se logró observar el perfil de expresión de miR-125a y miR-125b, durante el fenómeno de regeneración de extremidad en *A. mexicanum*. En los días 5 y 14 post-amputación se observó una disminución de la expresión de ambos miRNAs de aproximadamente 8 veces durante la formación y proliferación del blastema. Se había observado previamente la disminución del nivel de expresión de miR-125b durante la regeneración de cola, en la cual se observó una disminución de aproximadamente 2 veces al día 1 y de 4 veces al día 7 (figura 33A y 33B) (Quiroz *et al.* 2014). En regeneración de extremidad posterior miR-125a y miR-125b mostraron una regulación negativa de 8 veces al día 17 (figura 33C) (Holman *et al.* 2012). En contraste en tiempos tardíos (día 21 post-amputación) observamos un aumento en el nivel de expresión de miR-125a y miR-125b. Este aumento del nivel de expresión supone la represión de los blancos implicados en el mantenimiento de la troncalidad. De esta forma miR-125a y miR-125b promueve de forma indirecta la maduración del blastema y re-diferenciación del tejido (Figura 35).

Las secuencias primarias de miR-125a y miR-125b muestran un perfil de expresión negativa durante las etapas de formación y proliferación del blastema, así como un aumento durante la maduración, re-diferenciación y morfogénesis, al igual que las secuencias maduras de pri-miR-125a y pri-miR-125b. Dicho perfil de expresión de las secuencias primarias y maduras es indicativo que la regulación de miR-125 durante el fenómeno de regeneración es a nivel transcripcional, correlacionando directamente la cantidad de miRNA maduro con la cantidad presente de microRNA primario (Figura 34).

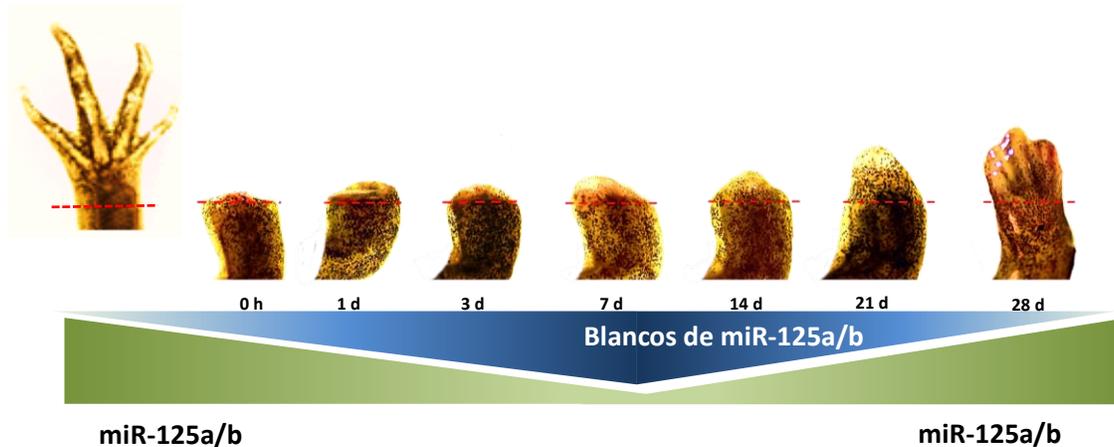


**Figura 33.-** Nivel de expresión de miR-125b durante regeneración de cola de *A. mexicanum*. (A) Mapa de calor en el cual es apreciado el nivel de expresión de miR-125b al día 1 y día 7 post-amputación, puede apreciarse la disminución de expresión -2 (fold change) al día 1 post amputación así como una expresión negativa de -4 al día 7 post-amputación (fold change) (recuadro rojo)  $P < 0.01$ . (B) Confirmación por qRT-PCR del nivel de expresión de miR-125b en el cual se puede apreciar una disminución de aproximadamente 3000% en la región rostral y de 1000% en la región caudal al día 1 post-amputación, así como una disminución aproximada de 3000% en la región rostral y de 1500% en la región caudal al día 7 post-amputación (barras azules)  $P < 0.001$ . (C) Nivel de expresión de miR-125a y miR-125b al día 17 post-amputación durante regeneración de extremidad anterior de *A. mexicanum*. (A,B) Tomado de Días *et al.* 2014 y (C) Holman *et al.* 2012.



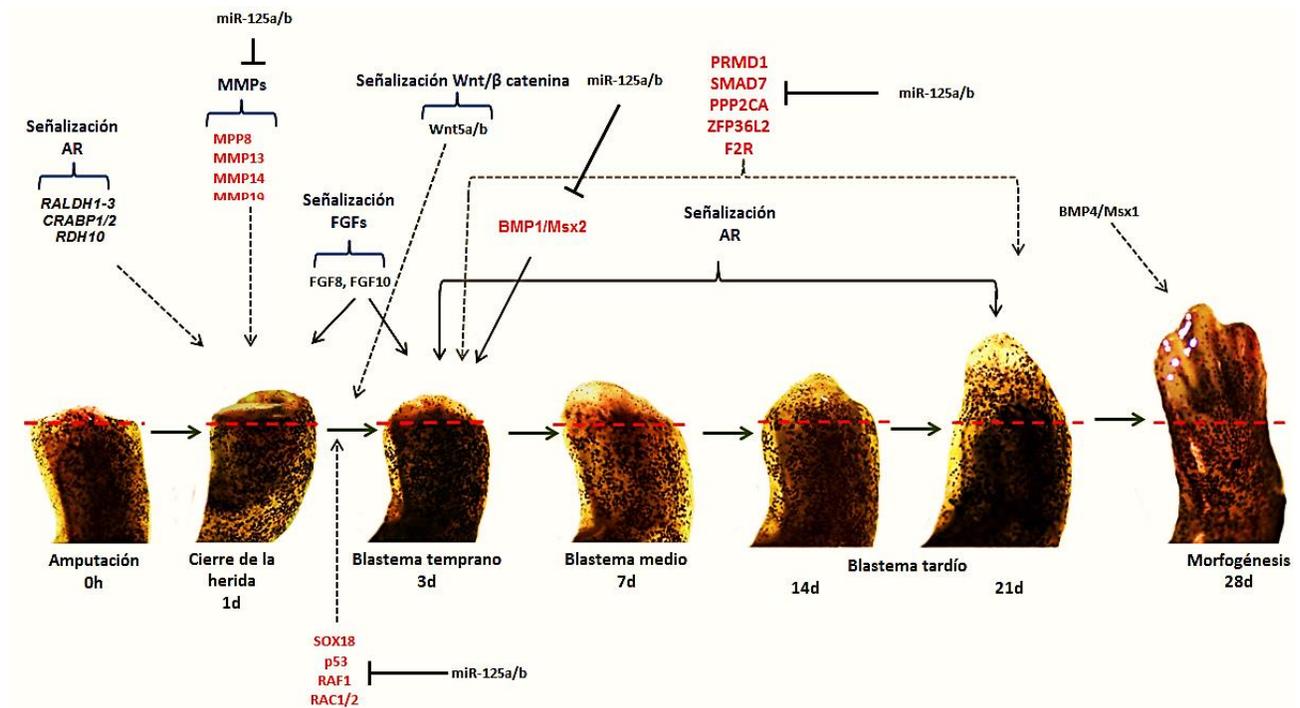
**Figura 34.-** Posible regulación de miR-125a/b durante regeneración de extremidad. (A) bloqueo de la expresión de miR-125a/b a nivel transcripcional durante regeneración de extremidad. (B) Expresión de miR-125a/b en estado diferenciado no regenerativo.

Algunos blancos de miR-125a y miR-125b involucrados en estos procesos celulares presentan sobre-regulación de sus transcritos durante los tiempos de regeneración analizados. En estos tiempos el nivel de expresión de miR-125a y miR-125b disminuye, permitiendo que la tasa de traducción de sus transcritos blanco aumente. Dentro de estos blancos se encuentran varios genes que intervienen en procesos de proliferación celular, entrada a ciclo celular y movimiento celular. Estos procesos han destacado por ser fundamentales en la correcta formación, mantenimiento y proliferación del blastema durante la regeneración de extremidad. En tiempos tardío de regeneración (21 días post-amputación), el nivel de expresión de miR-125a y miR-125b aumenta. Esto implicaría que el nivel de traducción de los blancos disminuya paulatinamente, lo cual implicaría la pérdida de la troncalidad celular. Durante esto estos tiempos se puede observar fisiológicamente la maduración del blastema que posteriormente comenzará a entrar en un proceso de re-diferenciación y subsecuentemente formara el miembro amputado (Figura 35).



**Figura 35.-** La regulación de miR-125a y miR-125b durante el proceso de regeneración permite la traducción de genes implicados en promover la formación y proliferación del blastema, modulando el estado de diferenciación celular durante la regeneración de extremidad.

Otros blancos potenciales que han sido identificados son aquellos involucrados en múltiples rutas de desarrollo de extremidad, como lo son wnt-catenina, señalización de fgf, vía de Noch y señalización de Ácido retinoico (AR), las cuales se ha observado que regulan la regeneración de extremidad (Yokohama, 2008). Sin embargo la mayoría de los blancos implicados en dichas rutas son principalmente receptores que se encuentran cascada abajo en dichas rutas de señalización. Entre otros blancos se identificaron algunas MMPs necesarias para el cierre de la herida, proto-oncogenes (sox18, p53, RAF1, RAC1 y RAC2) los cuales se presume son necesarios para la reprogramación celular necesaria para la formación del blastema y PRMD1, SMAD7, PPP2CA, ZFP36L2 y F2R genes implicados en la regulación negativa de la diferenciación de células madre, presentes en la maduración y mantenimiento del blastema (Figura 36).



**Figura 36.-** Se observan los potenciales genes blanco de miR-125 implicados en vías necesarias para la regeneración de extremidad (Rojo), como lo son MMPs necesarias para el cierre de la herida, proto-oncogenes implicados en la inducción de la formación y mantenimiento del blastema, así como genes de desarrollo de extremidad.

## VII.- CONCLUSIONES

La presencia de 2 miembros de la familia miR-125 en *A. mexicanum* y su perfil de expresión en los múltiples tejidos supone la expresión tejidos específica de miR-125a y miR-125b, así como la posible presencia de al menos dos loci dentro del genoma que codifiquen para miR-125b. El nivel de expresión de miR-125a y miR-125b durante la regeneración de extremidad es inverso al estado de diferenciación celular presente durante los estadíos de regeneración. Este perfil de expresión se había observado en múltiples líneas celulares en las cuales el incremento del nivel de expresión de miR-125 induce la diferenciación celular. La disminución del nivel de expresión de miR-125 induce la desdiferenciación y promueve la malignidad en múltiples tipos de cáncer. En el caso de la regeneración de extremidad miR-125 podría estar actuando como un modulador de la formación del blastema a través de sus múltiples blancos.

Los blancos predichos para ambos miRNAs mostraron estar directamente involucrados en procesos de regulación esenciales para la formación, mantenimiento y proliferación del blastema. Dentro de los cuales se presentan blancos que modulan el desarrollo de extremidad en etapas embrionarias, y que pertenecen a múltiples vías de regulación como lo son la vía de Wnt, Notch y FGF. Estas vías de señalización han sido descritas como esenciales para la correcta regeneración de la extremidad. Otros blancos que han sido predichos y son esenciales para la regeneración de extremidad son aquellos que regulan la proliferación, el movimiento y ciclo celular. Estos genes son sobre-expresados durante las etapas de mantenimiento y proliferación del blastema. Esto nos permite correlacionar la regulación de miR-125a y miR-125b como un modulador necesario para permitir la diferenciación celular presente durante la regeneración de extremidad. Sin embargo, es necesario comprobar dicha teoría mediante análisis funcional de ganancia y pérdida de función de ambos miRNAs durante el proceso de regeneración de extremidad.

## VIII.- BIBLIOGRAFÍA.

- Yokoyama Hitoshi. (2008). Initiation of limb regeneration: The critical steps for regenerative capacity. *Develop. Growth Differ.* 50, 13-22.
- Carlson M. Bruce. (2005). Some Principles of Regeneration in Mammalian Systems. *The Anatomical Record (Part B: NEW ANAT.)* 287B:4-13
- Agata K., Saito Y., Nakajima E. (2007). Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Develop Growth Differ* 49: 73-78.
- Zamora Servin Ericka. (2011). Tesis de pregrado "Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el zoológico de chapultepec". Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Anoop Kumar and Andrés Simon (eds). (2015). *Salamanders in Regeneration Research: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York: © Springer Science+Business Media.
- Holman E.C., Campbell L.J., Hines J., *et al.* (2012) Microarray Analysis of microRNA Expression during Axolotl Limb Regeneration. *PLoS ONE* 7(9): e41804.
- Stewart R., Rascon C.A., Tian S., *et al.* (2013) Comparative RNA-seq Analysis in the Unsequenced Axolotl: The Oncogene Burst Highlights Early Gene Expression in the Blastema. *PLoS Comput Biol* 9(3): e1002936.
- Knapp D., Schulz H., Rascon C.A., *et al.* (2013) Comparative Transcriptional Profiling of the Axolotl Limb Identifies a Tripartite Regeneration-Specific Gene Program. *PLoS ONE* 8(5): e61352.
- Minju H. and Narry Kim. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *NATURE REVIEWS*, 15, 509-524.0
- Makanae A., Mitogawa K., Satoh A. (2014) Co-operative Bmp- and Fgf-signaling inputs convert skin wound healing to limb formation in urodele amphibians. *Dev. Biol.* 396, 57-67.
- Elizabeth J. Thatcher and James G. Patton (2010) Small RNAs have a big impact on regeneration, *RNA Biology*, 7:3, 333-338.
- Thatcher E.J., Paydar I., Anderson K.K., *et al.* (2008) Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105, 18384-18389.
- Sehm T., Sachse C., Frenzel C., *et al.* (2009) MiR-196 is an essential early-stage regulator of tail regeneration, upstream of key spinal cord patterning events. *Dev Biol*, 334:468-80.

Holman E.C., Campbell L.J., Hines J., *et al.* (2012) Microarray Analysis of microRNA Expression during Axolotl Limb Regeneration. PLoS ONE 7(9): e41804.

Kawakami Y., Rodriguez E. C., Raya M. *et al.*, (2006). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. Genes Dev. 20, 3232-3237.

Han M., Yang X., Farrington J. E., *et al.* (2003). Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. Development 130, 5123-5132.

Beck C. W., Christen B., Barker D. *et al.* (2006). Temporal requirement for bone morphogenetic proteins in regeneration of the tail and limb of *Xenopus* tadpoles. Mech. Dev. 123, 674–688.

Vinarsky V., Atkinson D. L., Stevenson T. J., *et al.* (2005). Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. Dev. Biol. 279, 86-98.

Santosh N., Windsor J., Mahmoudi B.S., *et al.* (2011). Matrix Metalloproteinase Expression During Blastema Formation in Regeneration-Competent Versus Regeneration-Deficient Amphibian Limbs. Dev. Dyn. 240, 1097-0177.

Endo T., Bryant S.V. and Gardiner. D.M. (2004). A stepwise model system for limb regeneration. Dev. Biol. 270, 135-145.

Lagos M.Q., Rauhut R., Yalcin A., *et al.* (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr. Biol. 12, 735-739

Sun Y.M., Lin K.Y., Chen Y.Q. (2013) Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. J Hematol Oncol.6:6.

Wong S.S.Y., Ritner C., Ramachandran S., *et al.* (2012) miR-125b Promotes Early Germ Layer Specification through Lin28/let-7d and Preferential Differentiation of Mesoderm in Human Embryonic Stem Cells. PLoS ONE 7(4): e36121.

Wu L. and Belasco J.G.(2005). Micro-RNA Regulation of the Mammalian lin-28 Gene during Neuronal Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells .Mol. Cell. Biol., 25(21):9198-9208.

Maller B. R. S., Esquela A.K. and Slack F.J. (2005). Reciprocal expression of lin-41 and the microRNAs let-7 and mir-125 during mouse embryogenesis. Dev Dyn., 234(4): 1046-1054

Scott G.K., Goga A., Bhaumik D., *et al.*(2007). Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. J Biol Chem., 282:1479-86.

Wu J.G., Wang J.J., Jiang X., *et al.* (2014) MiR-125b promotes cell migration and invasion by targeting PPP1CA-Rb signal pathways in gastric cancer, resulting in a poor prognosis. Gastric Cancer.

Ufkin M.L., Peterson S., Yang X.P., *et al.* (2014). miR- 125a regulates cell cycle, proliferation, and apoptosis by targeting the ErbB pathway in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.*, 38:402-410.

Moss E.G., Tang L. (2003) Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev. Biol.*, 258: 432-442.

## Anexo A

Secuencias de adaptadores utilizados en el filtrado de calidad de librerías de smallRNAs de librerías de tejidos para el paquete Trimmomatic 0.32.

nombre	Secuencia
1	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTTTGGAATTCTCGGGTGCCA
2	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTTGAATTCTCGGGTGCCAA
3	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG
4	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
5	ACCAGGTGCTGTAGGCATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCACA
6	TGCTTGACTACATATGGTTGAGGGTTGTATGGAATTCTCGGGTGCCAAGG
7	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCCTTGAATTCTCGGGTGCCA
8	ATACCAGGTGCTGTAGGCATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCA
9	ACCAGGTGCTGTAGGCATTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
10	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTTGTGGAATTCTCGGGTGCC
11	TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCC
12	TTCACAGTGGCTAAGTTCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTC
13	ATACCAGGTGCTGTAGGCATTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGT
14	ATACCAGGTGCTGTAGGCATTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTC
15	ACCCTGTAGAACCGAATTTGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGT
16	TACCAGGTGCTGTAGGCATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
17	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGTGGAATTCTCGGGTGCCA
18	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCTGGAATTCTCGGGTGCCAAG
19	AAGAAGCCCGCTCGCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
20	TACCAGGTGCTGTAGGCATTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTC
21	ACCAGGTGCTGTAGGCATTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCA
22	TACCAGGTGCTGTAGGCATTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCA
23	CGACTGGGGTGGACTGTCCTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTC
24	ACGGCGACGATGCATTCGGATGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
25	AACTGCTGAAGACTGTCAGATCCAACCTGATCTGGAATTCTCGGGTGCCA
26	CGGAAGCTAAGCAGGGTCGGCCTGGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAAAC
27	CGGAAGCTAAGCAGGGTCGGCCTGGTTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAA
28	GTTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTTCGCCGTGGAATTCTCGGGTGCCA
29	AATACCAGGTGCTGTAGGCATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTC
30	GCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCGTGGAATTCTCGGGTGCCAA
31	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG
32	TACGACCTCAGATCAGACGTGGCGACCCGCTGAATTGGAATTCTCGGGTGC
33	TCAGTGCCTACAGAACCTTTGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
34	AGAAGCCCGGCTCGCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCACA
35	TAAGAAGCCCGGCTCGCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCA
36	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
37	ACACACGGCCGGTACAGTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCA
38	CCCGGGCCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCACATCACGATCT

Secuencias de adaptadores utilizados en el filtrado de calidad de librerías de smallRNAs de librerías de tejidos para el paquete Trimmomatic 0.32.

nombre	Secuencia
39	GTAAGAAGCCCGGCTCGCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTC
40	GCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTGGAATTCTCGGGTGCCAAG
41	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTTGAATTCTCGGGTGCCA
42	CCAGGTGCTGTAGGCATTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
43	ATACCAGGTGCTGTAGGCACTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTC
44	TACGACCTCAGATCAGACGTGGCGACCCGCTGAATTTGGAATTCTCGGGTG
45	AATACCAGGTGCTGTAGGCATTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
46	AAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCC
47	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
48	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
49	GTTCCGTAGTGTAGTGGTTATCACGTTGCGCTGTGGAATTCTCGGGTGCC
50	ACCCTGTTGAGCTTGACTCTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTC
51	CAAACGAGAACTTTGAAGGCCGAAGTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTC
52	CGACACTTCGAACGCACCTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCA
53	AATACCAGGTGCTGTAGGCATTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGT
54	CAACGGAATCCAAAAGCAGCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCA
55	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
56	CGTGGAGCCGGGCATCGTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCACA
57	AACGGGCTTGGCAGAATCAGCGGGGAATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACT
58	CGGCGACGATGCATTCCGATGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGT
59	ACCCTGTAGAACCGAATTTGTGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCA
60	GCCTTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCGTTTGAATTCTCGGGTGCCA
61	CGCCGATCTCGTCCGATTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
62	GGCCGTGATCGTATAGTGGTTAGTACTCTGCTGGAATTCTCGGGTGCCAAG
63	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGT
64	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTGGAATTCTCGGGTGCC
65	CGACTGGGGTGGACTGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCACA
66	GCCTACGGCCATACCACCCTGAATGCGCCCGATCTCGTGAATTCTCGGGT
67	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGATTCGGCGCTCTTGAATTCTCGGGTGC
68	ACGGCGACGATGCATTCCGATGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCA
69	CTAAGCAGGGTCGGGCCTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
70	AACGAGAACTTTGAAGTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCACAT
71	ACCAGGTGCTGTAGGCAATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
72	CGCCGATCTCGTCCGATCTCGTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
73	AAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAG
74	CAAACGAGAACTTTGAAGTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
75	CTAAGCAGGGTCGGGCCTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCA
76	CACACGGCCGGTACAGTGTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCAC
77	GCATGCGGACTTGGCATCGGCCTTGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCC
78	GAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTC



## Anexo C

Lista de miRNAs 100% conservados en *A. mexicanum*.

miRNA	miRNA	miRNA	miRNA	miRNA
miR-320a/b-3p	miR-22b-3p	miR-193b-3p	miR-22-5p	miR-96-3p
miR-93a-5p	miR-28a-5p	miR-3607-3p	miR-1805-5p	miR-460a-3p
miR-106b-5p	miR-3158-3p	let-7g-3p	miR-9a-1-3p	miR-460b-3p
miR-106a-5p	miR-5118	miR-210-3p	miR-208b-3p	miR-181c-5p
miR-99a	miR-93b	miR-378b	miR-208	miR-10d-5p
miR-451a-5p	miR-200c-3p	miR-219b-3p	miR-3964	miR-10c
miR-451b-5p	miR-23a/b	miR-219-3p	miR-10b-5p	miR-383-5p
miR-22	miR-34c-1-3p	miR-27b-5p	miR-217-5p	miR-10b/c-3p
miR-20b-5p	miR-425-5p	miR-27b-2-5p	miR-458	miR-27a-2-5p
miR-93a-5p	miR-215	let-7d-5p	miR-458	miR-1788-3p
miR-106a	miR-1246	miR-219-2-3p	miR-2188-3p	miR-34b-5p
miR-216a	miR-363-3p	miR-383-5p	miR-23b-1-3p	miR-456
miR-7-3p	miR-10b-3p	miR-10a-3p	miR-23b-2-3p	miR-456-3p
miR-3529-3p	miR-214-3p	miR-29a	miR-23a-3p	miR-204-3p
miR-21-3p	miR-6609-3p	miR-103a-3p	miR-23c	miR-199b
miR-338a-5p	miR-460-3p	miR-222a/b-3p	miR-217-3p	miR-130a-3p
miR-141	miR-460b-3p	miR-221	miR-1260	miR-130a/b-3p
miR-141-3p	miR-101c	miR-30c-2-3p	miR-1260a	miR-301a/b/c-3p
miR-200a	miR-199-3p	miR-133a-2-5p	miR-7550	miR-130a/c-3p
miR-2184-5p	miR-199a/c-3p	miR-133a-1-5p	miR-7975	miR-301b-3p
miR-2184	miR-199b-3p	miR-138a-5p	miR-1388-1-3p	miR-130b-3p
miR-499b-3p	miR-199b-3p	miR-138b	miR-3686	miR-130a/c-3p
miR-181c-5p	miR-1b/d-5p	miR-103a/b-5p	miR-200b-5p	miR-130a/b-3p
miR-181a-5p	miR-206-5p	miR-107-5p	miR-425-5p	miR-1957 <sup>a</sup>
miR-181c-5p	miR-140-3p	miR-107a-5p	miR-215	miR-140-5p
miR-181c-5p	miR-181a-2-3p	miR-27a-5p	miR-192a-5p	miR-101a-5p
miR-181b-5p	miR-181f	miR-28c	miR-215-5p	miR-142a/b-5p
miR-181b/c/e-5p	miR-181a-3/5p	miR-31a-5p	miR-455-3p	miR-142-5p
miR-181d-5p	miR-181a-3p	miR-31/72-5p	miR-183-5p	miR-142b-5p
miR-100a-5p	miR-181a-1-3p	miR-34c-5p	miR-135a-3p	miR-1b-5p
miR-99a/b-5p	miR-181a-2-3p	miR-449b-5p	miR-1357	miR-217-3p
miR-221-5p	miR-132b	miR-365-1-5p	miR-205a-3p	miR-425-3p
miR-122-3p	miR-10b	miR-365a-5p	miR-145a-3p	miR-5119
miR-122-3p	miR-181a-2-3p	miR-365a-1-5p	miR-363	miR-200a-5p
miR-9771b	miR-29b-3-5p	miR-27a-5p	miR-25	miR-200b-5p
miR-193a-3p	miR-132a-5p	miR-27a-5p	miR-137	miR-218a-3p
miR-193b-3p	miR-221-3p	miR-3962	miR-20b-5p	miR-6516-3p
miR-193b-2-3p	miR-221-5p	miR-2427	miR-93-5p	miR-126a/b-5p
miR-193a-2-3p	miR-212b-5p	miR-5106	miR-106/miR-17a-5p	miR-25
miR-183-3p	miR-1329-5p	miR-455-5p	miR-146a/b-5p	miR-184
miR-301a-3p	miR-140-3p	miR-92b-3p	miR-146c-5p	miR-122a-5p
miR-143-5p	miR-10b/d-5p	miR-92b	miR-143-3p	miR-31

Lista de miRNAs 100% conservados en *A. mexicanum*.

miRNA	miRNA	miRNA	miRNA	miRNA
miR-16a-2-3p	let-7c/d-3p	miR-144-5p	miR-33a-5p	miR-10c-5p
miR-194a/b-3p	let-7g-3p	miR-144-5p	miR-33b-5p	miR-2481
miR-199b-5p	miR-19	miR-4454	miR-24-2-5p	miR-217-5p
miR-181a-2-3p	miR-210-3p	miR-145-3p	miR-363-5p	miR-217b-5p
miR-181a-2-3p	miR-3620-5p	miR-31-5p	miR-3620-5p	miR-18b-3p
miR-181a-1-3p	miR-30a/d-3p	miR-31	miR-92-2-5p	miR-138-1-3p
miR-16b-3p	miR-30d-3p	miR-4448	miR-223-5p	miR-29d
miR-199b-5p	miR-30a/e-3p	miR-103a-5p	miR-124a-5p	miR-29a-3p
miR-199a/c-5p	miR-30e-3p	miR-1788-5p	miR-27b	miR-29a/b/c-3p
miR-199b	miR-30a	miR-365-1-5p	let-7c	miR-29d-3p
miR-199a-5p	miR-30d	miR-2904	miR-9a/b-3p	miR-29a/b-3p
miR-199a-5p	miR-129a/b-5p	miR-31	miR-9-3-3p	miR-29c-3p
miR-199b-5p	miR-4311	miR-449c-5p	miR-9b-3p	miR-15b-5p
miR-142-5p	miR-129-1-3p	miR-1587	miR-9a-3p	miR-195b
miR-460b-5p	miR-15b-3p	miR-762	miR-9b-3p	miR-195a-5p
miR-10b-5p	miR-2970-5p	miR-128-5p	miR-106a-5p	miR-195-5p
miR-205b	miR-2970-5p	miR-92a-5p	miR-20a-5p	miR-15a-5p
miR-26a-3p	miR-365-1-5p	miR-23b-5p	miR-141-3p	miR-15b/c-5p
miR-6927-3p	miR-2188-3p	miR-143-5p	miR-141/200a-3p	miR-15b-5p
miR-460a-5p	miR-145-3p	miR-9277	miR-132a/b-3p	miR-15 <sup>a</sup>
miR-222a-5p	miR-205-3p	miR-182-3p	miR-212a/b-3p	miR-16b-7c-5p
miR-7010-5p	miR-205-3p	miR-736	miR-124a/b-3p	miR-16a/b/c-5p
miR-363-5p	miR-205b-2-3p	miR-736-3p	let-7a-5p	miR-16c-5p
miR-126-3p	miR-1-5p	miR-101	miR-18a/b-5p	miR-15b
miR-223-5p	miR-1623	miR-101-3p	miR-200c-3p	miR-15c-5p
miR-124a-5p	miR-204-3p	miR-101a-3p	miR-200a/b-3p	miR-29e
miR-6414	miR-455-3p	miR-5108	miR-429b	miR-5112
miR-429	miR-4289	miR-142-3p	miR-236-3p	miR-21a-5p
miR-144-3p	miR-130a/c-5p	miR-2478	miR-429-3p	miR-21a/b-5p
miR-29b	miR-2137	miR-455-2-5p	miR-429a-3p	miR-196a/b-5p
miR-29c	miR-551b-3p	miR-153b-5p	miR-216a/b-5p	miR-196b-5p
let-7a-3p	miR-138-1-3p	miR-145	miR-216a/b-5p	miR-196c-5p
let-7a	miR-31-3p	miR-145-5p	miR-365a/b-3p	miR-196d
let-7f-3p	miR-222a-5p	miR-145a-5p	miR-214-3p	miR-2354
miR-181b-3p	miR-8117	miR-145b	miR-101b-3p	miR-454b-3p
miR-421-5p	miR-301b-5p	miR-2889	miR-101a/b-3p	miR-208b
miR-155-3p	miR-133a/c-5p	miR-143	miR-101b-3p	miR-183-5p
miR-1386	miR-133a-5p	miR-203b-3p	miR-199a/b/c-3p	miR-135a/b-5p
miR-126-3p	miR-133b-1-5p	miR-203a-3p	miR-144-3p	miR-455a/b-5p
miR-137a-3p	miR-137b-3p	miR-137b-3p	miR-137a-3p	miR-137b-3p
miR-33	miR-10a/c-5p	miR-92a/b-3p	miR-4510	miR-449 <sup>a</sup>
miR-33-5p	miR-10c-5p	miR-137a-3p	miR-6130	miR-449a-2-5p
miR-33a	miR-10a-5p	miR-138-2-3p	let-7e-5p	miR-34a/b-5p

Lista de miRNAs 100% conservados en *A. mexicanum*.

miRNA	miRNA	miRNA	miRNA	miRNA
miR-124a/c-3p	let-7k	miR-34-5p	miR-26b-2-5p	miR-129a/b-3p
miR-9226	miR-98-5p	miR-24c-3p	miR-27e-3p	miR-99a-3p
miR-128a/b-3p	let-7h-5p	miR-24a-3p	miR-27a-3p	miR-22a-3p
miR-148a-3p	let-7e-1-5p	miR-24b-3p	miR-27b/d-3p	miR-22
miR-152-3p	let-7f-1-5p	miR-144-5p	miR-27c-3p	miR-22-3p
miR-148b-3p	let-7f-2-5p	miR-23b-5p	miR-726	miR-22a
miR-152-3p	let-7j-2-5p	miR-133b-5p	miR-7977	miR-122a-3p
miR-148a/b-3p	let-7a-5p	miR-133-3p	miR-204a/b/miR-211-1-5p	miR-1306-3p
miR-101a-5p	let-7c-5p	miR-489-5p	miR-211-3-5p	miR-190b-3p
miR-338a-3p	let-7b-5p	miR-182-3p	miR-204b	miR-130a/b-5p
miR-145	let-7e-2-5p	miR-29b-2-5p	miR-202-2-5p	miR-17a-1-3p
miR-142	let-7g-5p	miR-30b/d-5p	miR-217a	miR-18a-3p
miR-125c-5p	let-7g-5p	miR-30b/e-5p	miR-5416	miR-143-5p
miR-125b-5p	let-7i-5p	miR-30a/c-5p	miR-1662	miR-130b
miR-125a-5p	let-7b	miR-30a-5p	miR-1662-5p	miR-203a-5p
miR-155-3p	let-7d-5p	miR-30d-5p	miR-7641	miR-140-5p
miR-205a/b-1-5p	let-7g/j	miR-30c/e-5p	miR-2404	miR-122b
miR-205a/b-2-5p	let-7j	miR-194c-5p	miR-153a/b-3p	miR-142a-3p
miR-6767-5p	miR-627-5p	miR-194a-5p	miR-137	miR-10a-3p
miR-101b-5p	miR-190a-5p	miR-1692	miR-9346	miR-7a-3p
miR-126a-3p	miR-190b-1-5p	miR-135a-3p	miR-133a/b/c/d-3p	miR-21-3p
miR-126b-3p	miR-190b-5p	miR-142a/b-3p	miR-133a	miR-191-5p
miR-187-3p	miR-219a/b/c-5p	miR-3963	miR-218a/b-5p	miR-99b-3p
miR-139-2-5p	miR-455-3p	miR-223-3p	miR-30d-3p	miR-99a-3p
miR-3473	miR-24b-5p	miR-223-3p	miR-30d-3p	miR-25-3p
miR-150-5p	miR-24-1-5p	miR-46-3p	miR-30e-3p	miR-6240
miR-150-5p	miR-214-5p	miR-3618	miR-30a-3p	miR-93
miR-8103	let-7i-3p	miR-346-1-5p	miR-216c-3p	miR-16b-3p
miR-9341	miR-31a-3p	miR-346	miR-182-5p	miR-16a-3p
miR-200b-5p	miR-31-1-3p	miR-19d-1-3p	miR-96-5p	miR-140-3p
miR-9b-5p	miR-3965	miR-19d-2-3p	miR-133a/b-3p	miR-192
miR-9a/b-5p	miR-7a/c-5p	miR-19b/c-3p	miR-133c-1-3p	miR-192-5p
miR-71-5p	miR-7b	miR-19a-1-3p	miR-133c-3-3p	let-7i-3p
miR-203b-3p	miR-1a/b-3p	miR-223-5p	miR-375-3p	miR-7a
miR-183-3p	miR-1	miR-499b-5p	miR-30d-2-3p	miR-29b-5p
miR-1973	miR-1-3p	miR-499a-5p	miR-375	miR-3607-3p
miR-192-5p	miR-206-3p	miR-124a-3p	miR-2340	miR-30e
miR-146b/d-5p	miR-1b/d-3p	miR-155-5p	miR-31-5p	miR-30a
miR-146a-5p	miR-184-2-3p	miR-155-5p	miR-144-5p	miR-129a-3p
miR-137b-3p	miR-26a-2-5p	miR-26a/b/c-5p	miR-26d-5p	

## Anexo D

Secuencias reportadas de miR-125 en la base de datos de miRbase23 después del colapso de la base de datos.

Nombre	Sentido	Secuencia
<b>miR-125a</b>	<b>5p</b>	<b>UCCUGAGACCCUUAACCU**</b>
miR-125a	5p	UCCUGAGACCCUUAACC*
<b>miR-125b</b>	<b>5p</b>	<b>UCCCTGAGACCCUAACUUG</b>
miR-125c	5p	UCCUGAGACCCUAACUCG

Secuencias reportadas de miR-125 en base de datos de miRbase 23, Se puede apreciar en color rojo aquellas que fueron identificadas en las librerías de RNAs pequeños de *A. mexicanum*.

\*Secuencia correspondiente a miR-125a, reportada generalmente en mamíferos.

\*\*Secuencia correspondiente a miR-125a, reportada generalmente en anfibios, reptiles y peces.

Alineamiento de las secuencias correspondientes de miR-125 de *A. mexicanum* contra las múltiples especies que presentaron homología del 100% de la base de datos de miRbase 23.

miR-125a		miR-125b	
<i>Ambystoma mexicanum</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Ambystoma mexicanum</i>	UCCUGAGACUCUAACUUGU GA-
<i>Xenopus tropicalis</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Xenopus tropicalis</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
<i>Danio rerio</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Anolis carolinensis</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
<i>Fugu rubripes</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Ophiophagus hannah</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Gallus gallus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
<i>Anolis carolinensis</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Taenio pygiaguttata</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
<i>Oryzias latipes</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Danio rerio</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
<i>Ictalurus punctatus</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Fugu rubripes</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
<i>Salmo salar</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
<i>Ophiophagus Hannah</i>	UCCUGAGACCCUUAACCUUG-	<i>Petromyzon marinus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Oryzias latipes</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Cyprinus carpio</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Ictalurus punctatus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Salmo salar</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Mus musculus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Homo sapiens</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Gorilla gorilla</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Ateles geoffroyi</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Pan paniscus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Pongo pygmaeus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Pan troglodytes</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Macaca mulatta</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Saguinus labiatus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Macaca nemestrina</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Lemur catta</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Canis familiaris</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Rattus norvegicus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Sarcophilus harrisii</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Monodelphis domestica</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Cricetulus griseus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Eptesicus fuscus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Tupaia chinensis</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Sus scrofa</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Equus caballus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Bos taurus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-
		<i>Ornithorhynchus sanatinus</i>	UCCUGAGACCCUUAACUUGU GA-

Alineamiento de miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* contra diversas especies de vertebrados. miR-125a es 100% homologa respecto a 9 especies (anfibios, reptiles y peces), mientras que miR-125b es 100% homologa respecto a 36 especies (anfibios, reptiles, aves, peces y mamíferos).

## Anexo E

Predicción de secuencias precursoras de miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* a partir de sus secuencias primarias.

<i>A. mexicanum</i>	Especie (precursor)	Homología	Nucleótidos alineados	e-value	Secuencia precursora (nt)
amx_pri-miR-125a	dre-mir-125a-1	89.83	59	4.00E-16	80
amx_pri-miR-125b-1	xtr-mir-125b-2	95.18	83	5.00E-33	95
amx_pri-miR-125b-2	xtr-mir-125b-2	95.18	83	6.00E-33	95

Datos obtenidos del alineamiento de pri-miR-125a, pri-mi-r.125b-1 y pri-miR-125b-2 contra la base de datos de miRbase 23 (stem-loop database), en la cual se muestra las secuencias de las especies que presentaron mayor homología. amx= *A. mexicanum*, dre= *D. rerio*, xtr= *X. tropicalis*, nt= nucleótidos.

Secuencia	Longitud (nt)	Secuencia
pre-miR-125a	85	AGCAUGCCUCGUUGUCCUGAGACCCUUAACUGUGAGGGAGACUGAGGUCACAGGUGAGGCUCUUGGGAACUGUGUGGCAUGCA
pre-miR-125b	90	UUGGACUUUUCUAGUCCUGAGACCCUAACUUGUGAGGACUUUUUGGCAAUGAUCACAAGUUAGGCUCUUGGGACCUAGGCGGAGAGGA

Secuencias putativas a pre-miR-125a y pre-miR-125b predichos a partir de las secuencias primarias (pri-miR-125a/b) de *A. mexicanum*. Las secuencias fueron flanqueadas en base a la homología presentada contra los precursores de pre-miR-125 reportados en miRbase (stem-loop database). Pre-miR-125b es 100% homologa en ambos pri-miR-125b-1 y pri-miR-125b-2. nt= nucleótidos.

## Anexo F

Lista del total de blancos predichos para miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* en regeneración y tejidos. Se muestran los entrez ID de cada gen predicho de la base de datos de uniprot ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)).

ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
A0A0A0MQQ9	A1L0Y5	B0BM36	C9JIK8	F6PX16	F6REY1	F6SP92	F6TSX2
A0A0A0MQR1	A1L1E5	B0BMG8	C9JVV1	F6PX75	F6RF43	F6SPP9	F6TTS0
A0A0A0MRE3	A1L188	B0BMH4	C9JLM6	F6PY59	F6RF85	F6SQB1	F6TTU0
A0A0A0MRS8	A2A2V4	B0BMK4	D6R9A8	F6PZL1	F6RGM0	F6SQC4	F6TU89
A0A0A0MRV0	A2A3L6	B0JYZ0	D6R992	F6Q0Q6	F6RIJ3	F6SRT1	F6TUC5
A0A0A0MS50	A2AAY8	B0JZU2	D6RBC4	F6Q3V5	F6RJT6	F6SSA1	F6TWH3
A0A0A0MS79	A2PYH4	B0JZV4	D7REX8	F6Q6A9	F6RJY4	F6SSC7	F6TZR0
A0A0A0MT23	A2RU67	B1AH80	E5RFF3	F6Q7D8	F6RKL3	F6SSH3	F6U0P4
A0A0A0MTN0	A3KN83	B1B1H9	E5RFJ0	F6Q8E7	F6RKX2	F6SSV1	F6U0Z3
A0A0A0MTR3	A4IGM9	B1H1F7	E5RIF6	F6Q9P3	F6RMA7	F6ST94	F6U1T2
A0A0A6YYA9	A4IGU6	B1H1G2	E7EN32	F6Q9S0	F6RNT7	F6SUB4	F6U3E4
A0A0B4J1U9	A4IH74	B1H2M6	E7EQS8	F6Q156	F6RNV6	F6SV00	F6U3I2
A0A0B4J1Z0	A4IHD9	B1H2V1	E7ET40	F6Q456	F6RNW5	F6SVL1	F6U4A4
A0A0C4DFM0	A4IHF0	B1H2W3	E7ETK0	F6Q672	F6RPC6	F6SWN8	F6U4G3
A0A0C4DGP9	A4IHJ1	B1H3J5	E7EU13	F6Q777	F6RQD5	F6SXI5	F6U5L6
A0A0C4DGZ0	A4IHN5	B1H116	E7EX48	F6QAX3	F6RRF5	F6SXS8	F6U6D7
A0A044PYE0	A4IHS8	B1H120	E9PCA3	F6QAZ7	F6RTA3	F6SXX7	F6U6K4
A0A075B6H2	A4IHU3	B1H147	E9PDD2	F6QBY2	F6RTK3	F6SZJ7	F6U6W4
A0A075B749	A4IID4	B1H387	E9PEW5	F6QD10	F6RVU2	F6T2C4	F6U7H9
A0A087WSV0	A4IIN5	B1WAR9	E9PFR3	F6QDG6	F6RXC1	F6T4I0	F6U7J8
A0A087WSX0	A4IIV6	B1WAZ6	E9PG46	F6QEZ1	F6RYL1	F6T4Z3	F6U7N4
A0A087WTI7	A4QNE5	B1WB71	E9PHH0	F6QG95	F6RZ90	F6T5Y6	F6U7Z9
A0A087WTW5	A5YKK6-4	B2GUI5	E9PIH6	F6QH01	F6S2P9	F6T6D9	F6U8H8
A0A087WUJ7	A6NCT7	B2GUT3	F2Z2Y8	F6QIR2	F6S2W6	F6T9R4	F6U8N7
A0A087WUL0	A6NHM9	B3DL55	F5GZ78	F6QJZ3	F6S3W5	F6T218	F6U8V8
A0A087WUL4	A6NJI9	B3DLD3	F5GZZ6	F6QK10	F6S4D3	F6T226	F6U204
A0A087WV87	A6NKG5	B3DM51	F5H0N7	F6QK42	F6S4P1	F6T394	F6U483
A0A087WW59	A6NMZ7	B4DFN3	F5H4X5	F6QKF0	F6S4R8	F6T774	F6U531
A0A087WWK8	A6NNL5	B4DHQ7	F5H5R8	F6QLU9	F6S5F7	F6T828	F6U654
A0A087WYN7	A8E5U0	B4DIB3	F6PJ32	F6QNK4	F6S9K5	F6T983	F6UAA1
A0A087WYY6	A8K727	B4DV11	F6PK27	F6QNW6	F6S208	F6T994	F6UAG0
A0A087WZ08	A8MQ07	B4F6I7	F6PKK5	F6QPD2	F6S563	F6TA33	F6UCG5
A0A087WZ43	A8MT70-2	B5A958	F6PLL7	F6QTK9	F6S572	F6TAG8	F6UCS6
A0A087WZB3	A8MTF8	B5DEV1	F6PLM5	F6QTQ9	F6SAH7	F6TAZ5	F6UD28
A0A087X0J2	A8MU46	B5DEV3	F6PPC5	F6QUE0	F6SBM9	F6TCS3	F6UE96
A0A087X0M8	A8MV65	B5DEW2	F6PQ47	F6QUP1	F6SCY4	F6TD17	F6UFE1
A0A087X1Q1	A8MWW9	B7WPE2	F6PQR6	F6QUP8	F6SDB1	F6TEC3	F6UH88
A0A087X2B0	A8MX76-2	B7Z3L0	F6PSQ8	F6QX16	F6SGS0	F6TEH8	F6UIE1
A0A087X169	A8WGI0	B7Z6T3	F6PT86	F6QX63	F6SH44	F6TELO	F6UIJ4
A0JLZ7	A8WH14	B7ZTQ7	F6PTP9	F6QYZ1	F6SI66	F6TFA4	F6UKG5

Lista del total de blancos predichos para miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* en regeneración y tejidos. Se muestran los entrez ID de cada gen predicho de la base de datos de uniprot ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)).

| ID     |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| F6UT48 | F6VWS3 | F6WVB8 | F6XR37 | F6YP21 | F6ZL14 | F7AC43 | F7BPL1 |
| F6UTG9 | F6VYB6 | F6WXC7 | F6XRN6 | F6YPW6 | F6ZNB9 | F7ACLO | F7BPQ8 |
| F6UUC8 | F6VZU2 | F6X0I8 | F6XRR5 | F6YQ80 | F6ZND7 | F7AF82 | F7BQ45 |
| F6UVD5 | F6W1F9 | F6X0S5 | F6XSZ5 | F6YQI0 | F6ZNE4 | F7AFF4 | F7BRG6 |
| F6UVJ3 | F6W3V8 | F6X0X4 | F6XT30 | F6YQV3 | F6ZPL2 | F7AG20 | F7BSD4 |
| F6UW34 | F6W4K0 | F6X3M7 | F6XTF4 | F6YRZ1 | F6ZQ62 | F7AHZ4 | F7BT17 |
| F6UWC2 | F6W4P7 | F6X4Q0 | F6XUT0 | F6YSD6 | F6ZQI2 | F7AJ51 | F7BT43 |
| F6UY90 | F6W4X9 | F6X5A6 | F6XVI9 | F6YSE5 | F6ZQM1 | F7AJL1 | F7BU64 |
| F6UZ15 | F6W6P9 | F6X5L5 | F6XVK4 | F6YSY1 | F6ZRK1 | F7AKW4 | F7BUA3 |
| F6V1N0 | F6W6Q9 | F6X6C9 | F6XWG6 | F6YTF8 | F6ZRP4 | F7ALU5 | F7BUK5 |
| F6V1S6 | F6W6X7 | F6X6T9 | F6XWP7 | F6YUP8 | F6ZRR0 | F7AMI4 | F7BV87 |
| F6V3I9 | F6W7P5 | F6X7G4 | F6XWQ9 | F6YV58 | F6ZSA1 | F7AP77 | F7BVV6 |
| F6V4H1 | F6W7Q9 | F6X7M7 | F6XZD3 | F6YWC9 | F6ZSV2 | F7AQH9 | F7BW21 |
| F6V4I1 | F6W8H3 | F6X7U1 | F6Y0Q1 | F6YWK3 | F6ZTB1 | F7ARS2 | F7BWB1 |
| F6V5U0 | F6WAB2 | F6X8H6 | F6Y2F9 | F6YXD3 | F6ZUM4 | F7ARU8 | F7BXF6 |
| F6V6C1 | F6WAQ7 | F6X8I4 | F6Y2V0 | F6YY04 | F6ZUR5 | F7ARY0 | F7BXX1 |
| F6V6P2 | F6WAR4 | F6X8W3 | F6Y4A8 | F6YYL5 | F6ZUT7 | F7ASU1 | F7BZJ0 |
| F6V028 | F6WBB6 | F6X9H0 | F6Y4V7 | F6YYP2 | F6ZUZ6 | F7ATN3 | F7C0S8 |
| F6V060 | F6WCS5 | F6X144 | F6Y7C6 | F6YYP7 | F6ZW49 | F7ATR9 | F7C2M0 |
| F6V613 | F6WD25 | F6X360 | F6Y7G7 | F6YZC4 | F6ZW55 | F7ATU6 | F7C2M6 |
| F6V862 | F6WD56 | F6X475 | F6Y465 | F6YZU0 | F6ZX56 | F7AUQ2 | F7C4D9 |
| F6VA85 | F6WDE4 | F6X747 | F6Y480 | F6Z1H4 | F6ZY20 | F7AYD2 | F7C4F4 |
| F6VBY6 | F6WDT0 | F6XAK5 | F6Y553 | F6Z2I2 | F6ZYC1 | F7AZ24 | F7C4F9 |
| F6VD25 | F6WDW0 | F6XAS5 | F6YAM7 | F6Z3Q9 | F6ZYQ1 | F7AZF6 | F7C5T3 |
| F6VE94 | F6WE36 | F6XBT1 | F6YDG5 | F6Z4W1 | F6ZZC8 | F7AZI3 | F7C6K3 |
| F6VED7 | F6WFN4 | F6XC23 | F6YE36 | F6Z5L9 | F6ZZD7 | F7B2R7 | F7C8W9 |
| F6VEU3 | F6WGD3 | F6XDD6 | F6YER3 | F6Z7C8 | F6ZZJ2 | F7B3I3 | F7C9F4 |
| F6VG64 | F6WGI8 | F6XEH1 | F6YFA4 | F6Z7G3 | F6ZZQ7 | F7B5F5 | F7C9J7 |
| F6VHD0 | F6WHZ5 | F6XEZ0 | F6YFQ0 | F6Z7N5 | F7A0H1 | F7B8X9 | F7C9Y7 |
| F6VIU7 | F6WJC3 | F6XGA4 | F6YFX4 | F6Z7R0 | F7A1K2 | F7B216 | F7C074 |
| F6VJR9 | F6WJL0 | F6XGP4 | F6YGG5 | F6Z228 | F7A1M4 | F7B456 | F7C150 |
| F6VKD9 | F6WL16 | F6XGQ5 | F6YGG6 | F6Z990 | F7A2G7 | F7B645 | F7C290 |
| F6VKF8 | F6WL76 | F6XGS4 | F6YGL0 | F6ZA64 | F7A3A6 | F7BA52 | F7C313 |
| F6VKJ0 | F6WLJ5 | F6XHC4 | F6YH18 | F6ZBA2 | F7A4Z4 | F7BCE2 | F7C377 |
| F6VMF8 | F6WLW2 | F6XHL4 | F6YHM7 | F6ZC18 | F7A6M2 | F7BCQ1 | F7C436 |
| F6VML5 | F6WMI5 | F6XIJ0 | F6YI12 | F6ZC71 | F7A7Q0 | F7BEK4 | F7CBH3 |
| F6VNG6 | F6WMK5 | F6XJ91 | F6YJU2 | F6ZDU8 | F7A9V4 | F7BFZ8 | F7CD77 |
| F6VP47 | F6WN93 | F6XJP4 | F6YK94 | F6ZGR0 | F7A140 | F7BIU6 | F7CDY4 |
| F6VRI1 | F6WNG3 | F6XJS4 | F6YKJ7 | F6ZGV9 | F7A338 | F7BJ65 | F7CE64 |
| F6VS41 | F6WQ27 | F6XKX3 | F6YKM8 | F6ZH88 | F7A555 | F7BJK0 | F7CEB1 |

Lista del total de blancos predichos para miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* en regeneración y tejidos. Se muestran los entres ID de cada gen predicho de la base de datos de uniprot ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)).

ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
F7CIG7	F7DDR5	F7E8D8	F8VZ49	K7EPJ4	O14763-2	O60895-2	P0DMQ5
F7CJ47	F7DE91	F7E8G8	F8W8J5	K7EPM3	O14770	O60906	P00451
F7CLU4	F7DE97	F7E9F4	F8WC99	K9J7I9	O14770-4	O75030-12	P00736
F7CMB7	F7DES0	F7E210	G0XQ39	K9J7M8	O14874	O75037-3	P01031
F7CN03	F7DHI3	F7E265	G1K398	K9J7R7	O14908	O75054	P01375
F7CPA5	F7DIF7	F7E271	G3V1A4	K9J850	O14920	O75063	P02730
F7CQ53	F7DIQ0	F7E535	G3V1D3	K9J864	O14920-4	O75110	P02745
F7CQQ3	F7DJ06	F7E932	G3V3B9	K9J875	O14958	O75140-1	P02750
F7CS15	F7DJA3	F7EAQ0	G3V3J9	K9N1J3	O15033	O75144-3	P02786
F7CT64	F7DKG3	F7EAV0	G3V3X5	L7N2I2	O15047	O75150-4	P03950
F7CV31	F7DKS0	F7EAZ6	G3XAA4	L7N2M1	O15105	O75154	P04049
F7CWQ6	F7DL26	F7EBW5	G5E972	L7N2X2	O15120	O75179-7	P04632
F7CWZ5	F7DMV5	F7ED99	H0UI37	L7N2Z3	O15212	O75534-4	P05106
F7CX88	F7DMX8	F7EDE3	H0Y4J0	L7N3E0	O15231-2	O75626-3	P05107
F7CY00	F7DNL2	F7EDI8	H0Y5U7	L7N3H7	O15260	O75689	P06681
F7CYI2	F7DNN1	F7EEF8	H0Y6T7	L7N3R1	O15357	O75694	P06733
F7CYX2	F7DNW0	F7EEU8	H0Y7L2	L7N3V4	O15432	O75781	P06865
F7CZ39	F7DQ11	F7EFM2	H0Y7W7	L7N3W9	O15519	O75817	P07333
F7CZL8	F7DQ36	F7EFY8	H0Y9Z5	L7N320	O43149	O75864	P08138
F7CZZ5	F7DQH6	F7EH58	H0Y972	L7N429	O43150	O75888	P08572
F7D0K6	F7DR00	F7EHP0	H0YAD6	L7N490	O43166-2	O75955	P08754
F7D0L9	F7DR89	F7EIG6	H0YCG0	M0QY11	O43286	O76039-2	P09467
F7D0M7	F7DSH0	F7EIL7	H0YDJ3	M0R0W6	O43290	O94762	P09471-2
F7D1S7	F7DSX5	F7EJ68	H0YG38	M0R2M4	O43296	O94782	P09497-2
F7D002	F7DT93	F7EK50	H0YKG7	M0R300	O43299	O94874	P09619
F7D2Y8	F7DTI2	F7EK96	H3BNU0	O00168	O43299-2	O94887-3	P09651-3
F7D3T9	F7DU05	F7EKW3	H3BSZ2	O00170	O43347	O94921	P10124
F7D4Z7	F7DU42	F7EL29	H3BTI0	O00180	O43451	O94923	P10242
F7D5G2	F7DUE4	F7ELD9	H3BV44	O00186	O43541	O94985	P10600
F7D5L6	F7DUJ1	F7ELM4	H7BYE6	O00255-2	O43825	O95163	P11117
F7D6J3	F7DUN9	F7ELP4	H7C218	O00329	O43865	O95219	P11166
F7D6Z3	F7DVL7	F7ELV8	H7C269	O00370	O43913	O95382	P11277-2
F7D9V7	F7DX67	F7EM08	H7C415	O00429-2	O43918	O95461	P11362-21
F7D089	F7DXH6	F7EMG4	H7C456	O00469	O60229	O95479	P11388
F7D128	F7DXU2	F7EMN2	H9ME53	O00469-2	O60231	O95613	P11509
F7D171	F7DYV6	F7EQ60	I3L364	O00481-4	O60237-2	O95785-4	P11586
F7D240	F7DZC4	F7ERE3	I6L8K6	O00499-5	O60238	O95841	P12081
F7D286	F7E0D0	F7ESG2	J3KNL5	O00562	O60238-2	O95873	P12107-3
F7D820	F7E0N6	F7ESM6	J3KPK1	O00591	O60262	O95944-3	P12111
F7DA66	F7E0Q8	F7ESR1	J3KSZ8	O00602	O60296	O96019-2	P12980

Lista del total de blancos predichos para miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* en regeneración y tejidos. Se muestran los entrez ID de cada gen predicho de la base de datos de uniprot ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)).

ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
P13671	P26196	P46100-2	P61966	Q3MIR4	Q5T447	Q6GL20	Q6UX15-2
P13686	P26368-2	P46527	P61978	Q3SXZ7-2	Q5T481	Q6GL25	Q6UX40
P13760	P27448-3	P47895	P62070	Q3SY56	Q5T653	Q6GL60	Q6UX65
P14373-2	P27658	P48634-4	P62491	Q3SYC2	Q5TC79	Q6GL73	Q6UX71
P14598	P27708	P49327	P62745	Q4AE62	Q5TD94	Q6GMR7	Q6UXB8-2
P14735	P27918	P49419	P62820	Q4FAT2	Q5TEC3	Q6IQ22	Q6UXM1
P14921-4	P28562	P49642	P63010-2	Q4KKX4	Q5TGY3	Q6IWH7	Q6UXM1-2
P15018	P28845	P49746	P63027	Q4V9L6	Q5U4X5	Q6JBY9	Q6UXS0
P15153	P29320	P49902-2	P63215	Q4V9Y2	Q5VUA4	Q6K79	Q6VMQ6
P15169	P29992	P50222	P63261	Q4VA73	Q5VVJ2	Q6L9W6	Q6VY07
P15882-2	P30153	P50225	P67775	Q4VA85	Q5VWG9	Q6NUT3-4	Q6YBV0
P16389-2	P30260	P50542-2	P67809	Q4VAN1	Q5W0Q7	Q6NVN8	Q6YHK3-2
P17010	P31146	P50549-5	P68363	Q5BKJ7	Q5W0U4	Q6NVP8	Q6ZMT1
P17014-2	P31150	P50552	P78325	Q5BKP0	Q5XGD1	Q6NX19	Q6ZMT4
P17025	P31260-2	P50897	P78556	Q5BL60	Q5XGD3	Q6NXR0	Q6ZN57
P17036	P31513	P51116	P82987-2	Q5BL66	Q5XGD9	Q6NXT6	Q6ZP65
P17081	P32455	P51523	P98172	Q5BL67	Q5XGI0	Q6NYC8-4	Q6ZS81-3
P17301	P32456	P51532	Q0D2C3	Q5EAM8	Q5XH95	Q6P1S6	Q6ZT12
P17480	P33316-2	P51532-2	Q0D2I5	Q5FV93	Q6BDS2	Q6P1U5	Q6ZU80
P17858	P35247	P51575	Q0IHW4	Q5FVY1	Q6DF53	Q6P1X5	Q6ZVK8
P17948	P35442	P51687	Q0IIS3	Q5FWR9	Q6DFP4	Q6P2Y2	Q6ZW49-1
P17987	P35579	P51688	Q0IJ05	Q5G7I8	Q6DFR4	Q6P3S6	Q6ZWJ1
P18440	P35580-2	P51808	Q0P4J3	Q5GH21	Q6DFS6	Q6P4F7	Q7KYR7
P19012	P35590	P51814-2	Q0P4L0	Q5GLZ8-2	Q6DIE9	Q6P4Z2	Q7KYR7-5
P19022	P35626	P51858	Q0P4R9	Q5HZD2	Q6DIF5	Q6P9A2	Q7KZN9
P19174-2	P36508	P52179-2	Q0PNE2	Q5J8M3	Q6DIG8	Q6P335	Q7L0X2-3
P19320-3	P36508-2	P52569-2	Q0V9H1	Q5JXL1	Q6DIH2	Q6P346	Q7L8A9
P19474-2	P37231-2	P52735-3	Q0V9J0	Q5M7L9	Q6DIJ2	Q6P378	Q7LBC6
P19484	P39748	P52742-3	Q0V9K1	Q5M8H6	Q6DIJ4	Q6P816	Q7RTP6-3
P19784	P40424-2	P52788	Q0V9L1	Q5M8H7	Q6DIK5	Q6P824	Q7RTW8-4
P20132	P41091	P52954	Q0V9W5	Q5M8K3	Q6DIM9	Q6P834	Q7RTY0
P20333	P41240	P53621	Q0VA72	Q5M8K5	Q6DIN0	Q6P847	Q7T1R5
P20339	P42081-4	P53794	Q0V9H6	Q5NDE6	Q6DIN3	Q6P854	Q7Z2W4-3
P20800	P42167	P54259	Q0V9F0	Q5PRF9	Q6DIQ9	Q6PBC4	Q7Z2X4-4
P20908	P42226	P54725	Q0ZGT2-4	Q5QGT7	Q6DIR6	Q6PBF6	Q7Z2Y8
P20916-3	P42338	P54753	Q1XH10	Q5SR54	Q6DIW3	Q6PBF8	Q7Z3C6
P21127-4	P42345	P55001	Q2KHR2	Q5SV97-3	Q6DIW4	Q6PEY1	Q7Z3K6-2
P21399	P42574	P55107	Q2KHT3	Q5SW79-3	Q6DIX8	Q6PI97	Q7Z3T8
P22314	P42701-2	P55212	Q2KJY2-2	Q5SZL2-4	Q6DIY5	Q6PJW8	Q7Z3U7
P23276	P42892-3	P55285	Q2M3D2	Q5T3F8	Q6DJ41	Q6SA08-3	Q7Z3U7-3

Lista del total de blancos predichos para miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* en regeneración y tejidos. Se muestran los entrez ID de cada gen predicho de la base de datos de uniprot ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)).

| ID       |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Q7Z7M9   | Q8N999   | Q8WV44   | Q9BZL3   | Q9HBF4-2 | Q9NVU0   | Q9UGL1   | Q9UPV0-2 |
| Q7Z340-2 | Q8NA29-2 | Q8WVF1-3 | Q9C0B0   | Q9HBI0   | Q9NW15   | Q9UGM3-2 | Q9UQF2   |
| Q7Z388   | Q8NAA4   | Q8WVP7   | Q9C0C6   | Q9HBU9   | Q9NWF9-1 | Q9UGM3-4 | Q9UQL6   |
| Q7Z403-2 | Q8NAP3   | Q8WVV4-1 | Q9C0C9   | Q9HCE0   | Q9NWM3   | Q9UGM3-9 | Q9Y2B2   |
| Q7Z591-7 | Q8NB46   | Q8WWM9   | Q9C0F3   | Q9HCE6-2 | Q9NWW8   | Q9UH65   | Q9Y2D4   |
| Q7Z628-2 | Q8NBP5   | Q8WWQ8   | Q9C0G0   | Q9HCG7   | Q9NWW7   | Q9UHA4   | Q9Y2D8-2 |
| Q08CX7   | Q8NCE0   | Q8WWX9   | Q9C0K0-2 | Q9HCJ5   | Q9NX46   | Q9UHF4   | Q9Y2H5   |
| Q08D56   | Q8ND04   | Q8WWZ7-2 | Q9C037-3 | Q9HCM2   | Q9NXC5   | Q9UHP9   | Q9Y2I7   |
| Q08D64   | Q8NDI1-3 | Q8WX92   | Q9GZU0   | Q9HCM9-2 | Q9NXX6   | Q9UHV5   | Q9Y2L6-2 |
| Q8IUF8   | Q8NDV7-6 | Q8WXB4   | Q9GZX5   | Q9HCP0   | Q9NXP7-3 | Q9UI46   | Q9Y3P4   |
| Q8IUY3   | Q8NDX1-2 | Q8WXE0   | Q9GZX7   | Q9HD34   | Q9NY15   | Q9UIF3   | Q9Y3R5-2 |
| Q8IV36-2 | Q8NDZ2   | Q8WXH0   | Q9GZY8-4 | Q9NP50   | Q9NY59   | Q9UIG0   | Q9Y4C1   |
| Q8IVG5   | Q8NDZ6   | Q8WXH0-2 | Q9GZY8-5 | Q9NP84   | Q9NYA4   | Q9UIK4   | Q9Y4D1-2 |
| Q8IVM0   | Q8NEE6   | Q8WYA0   | Q9H0E2   | Q9NPB8   | Q9NYB9-2 | Q9UIK5   | Q9Y4D1-3 |
| Q8IVW6   | Q8NEE8   | Q8WYB5-3 | Q9H0G5   | Q9NPB9   | Q9NYL2-2 | Q9UJ71   | Q9Y4D7   |
| Q8IW19   | Q8NEG4   | Q8WYP3-2 | Q9H0W7   | Q9NQ11-3 | Q9NYP9   | Q9UJN7   | Q9Y4E5-4 |
| Q8IX21   | Q8NEV8-2 | Q8WZ74   | Q9H1A4   | Q9NQ32   | Q9NYQ8   | Q9UJX3   | Q9Y4K1   |
| Q8IXB1   | Q8NEY1-5 | Q9BQ04   | Q9H1C3   | Q9NQ48   | Q9NYT0   | Q9UKD1   | Q9Y4R8   |
| Q8IXQ3   | Q8NEY1-6 | Q9BQQ7   | Q9H1U4   | Q9NQH7-4 | Q9NYV4   | Q9UKE5-4 | Q9Y5A9   |
| Q8IY17-2 | Q8NEZ4-2 | Q9BQS8   | Q9H2G2   | Q9NQS1   | Q9NZB2-4 | Q9UKG1   | Q9Y5F6   |
| Q8IY67-2 | Q8NF50   | Q9BRZ2   | Q9H2Y7   | Q9NQV6-6 | Q9NZC2-2 | Q9UKI9   | Q9Y5G0-2 |
| Q8IY81   | Q8NF99   | Q9BSK0   | Q9H3E2   | Q9NQW6   | Q9NZJ4-2 | Q9UKL6   | Q9Y5G7   |
| Q8IYB1   | Q8NFD2   | Q9BSK1-2 | Q9H3R5   | Q9NQW6-2 | Q9NZJ5   | Q9UKW4   | Q9Y5Q9   |
| Q8IYY4   | Q8NFD5   | Q9BTC0   | Q9H4G0-4 | Q9NR00   | Q9NZM1   | Q9UKY1   | Q9Y5R4   |
| Q8J025   | Q8NFP4   | Q9BTC0-2 | Q9H4H8   | Q9NR55   | Q9NZM1-6 | Q9UL03   | Q9Y6J0   |
| Q8N0U4-3 | Q8NFU3   | Q9BTE6   | Q9H4L5-3 | Q9NR80   | Q9NZQ7   | Q9UL12   | Q9Y6K5   |
| Q8N0V3   | Q8NG68   | Q9BTX7   | Q9H5J4   | Q9NR82   | Q9P0L2   | Q9ULG1   | Q9Y6Q6-2 |
| Q8N1G2   | Q8TAC9-3 | Q9BUU2   | Q9H5V7   | Q9NRC8   | Q9P0L2-2 | Q9ULH0-4 | Q9Y251   |
| Q8N1S5-2 | Q8TAQ5   | Q9BUZ4   | Q9H5X1   | Q9NRD1   | Q9P0N5-3 | Q9ULH1   | Q9Y253   |
| Q8N2E2   | Q8TB03   | Q9BV44   | Q9H6B1   | Q9NRG4   | Q9P1T7   | Q9ULK4   | Q9Y279-2 |
| Q8N2M4   | Q8TBB0   | Q9BV68-2 | Q9H7F0   | Q9NRH2   | Q9P2F9   | Q9ULQ0   | Q9Y315   |
| Q8N2Z9   | Q8TBB1   | Q9BVG8-6 | Q9H7M9   | Q9NRM0-2 | Q9P2G9   | Q9ULW2   | Q9Y316   |
| Q8N3I7   | Q8TBP0   | Q9BVK2   | Q9H7Y0   | Q9NS68-2 | Q9P2K2   | Q9ULW8   | Q9Y383   |
| Q8N3V7-2 | Q8TDH9   | Q9BWL3   | Q9H7Z3   | Q9NS73-5 | Q9P2N7   | Q9UMS0   | Q9Y450-2 |
| Q8N5C7   | Q8TDM6   | Q9BXI6   | Q9H9L4   | Q9NS98   | Q9P2N7-2 | Q9UMS0-3 | Q9Y478   |
| Q8N5G2   | Q8TDY4   | Q9BY21   | Q9H9S5   | Q9NSE7   | Q9P2P1   | Q9UMZ2-5 | Q9Y487   |
| Q8N5I9   | Q8TE96   | Q9BYD2   | Q9H079   | Q9NTK1   | Q9P035   | Q9UN70   | Q9Y573   |
| Q8N6C5-2 | Q8TEQ0   | Q9BYE7   | Q9H171-6 | Q9NUG6   | Q9P218-3 | Q9UNF0-2 | Q9Y577-2 |
| Q8N6G5   | Q8TEW6   | Q9BYJ1   | Q9H330-3 | Q9NUJ3   | Q9P227   | Q9UNG2   | Q9Y653-2 |
| Q8N8F7   | Q8TF05   | Q9BYN8   | Q9HA90   | Q9NUP7   | Q9P267   | Q9UNL2   | Q24JP5   |

Lista del total de blancos predichos para miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* en regeneración y tejidos. Se muestran los entrez ID de cada gen predicho de la base de datos de uniprot ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)).

ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
Q28CM8	Q66IL0	Q96F85	Q96RW7-2	Q11201	Q14541-2	Q99439	F6PU47
Q28CP4	Q66JF8	Q96FE7	Q96RY7	Q12774-2	Q14554	Q99470	F6PUE2
Q28CY2	Q66JG2	Q96FE7-5	Q96T37-4	Q12789	Q14562	Q99471	F6PUX9
Q28D01	Q66KE4	Q96FH0-2	Q96T52	Q12797-10	Q14587-2	Q99487	F6PV49
Q28D09	Q68CJ6	Q96FV0	Q96T58	Q12802	Q14591	Q99542	F6PVD4
Q28D40	Q68CJ9	Q96G03	Q00169	Q12815	Q14642	Q99571	F6R3L2
Q28DB0	Q68DE3	Q96G97	Q501Q4	Q12873-3	Q14676-3	Q99593	F6R7N1
Q28DD8	Q68EP6	Q96GG9	Q569D5	Q12893	Q14765	Q99595	F6R9M3
Q28DK1	Q68EQ1	Q96HC4	Q569E0	Q12923-2	Q14789-2	Q99683	F6RDP8
Q28DY2	Q68ER5	Q96HC4-4	Q640B3	Q12955-5	Q14938-3	Q99700-5	F6REA3
Q28E35	Q69YN4-4	Q96HC4-6	Q640B4	Q12965	Q15019-2	Q99712	F6SK79
Q28E37	Q70Z35	Q96HH9	Q642T2	Q12979-4	Q15034	Q99733-2	F6SNA9
Q28E59	Q86T13	Q96HS1	Q969E1	Q13023	Q15054	Q99788-2	F6SNY2
Q28E90	Q86T65	Q96I34	Q969Q6	Q13043	Q15080	Q99835	F6SP35
Q28EB4	Q86T65-4	Q96I76	Q969U6	Q13061-3	Q15119	Q99933-3	F6SP77
Q28EC2	Q86TG7	Q96II5	Q01082-2	Q13094	Q15223	Q99972	F6THH1
Q28EW0	Q86TL0-2	Q96IZ0	Q01082-3	Q13107	Q15223-2	Q99996-2	F6TKZ0
Q28EZ7	Q86TV6	Q96JG6	Q01543-4	Q13112	Q15291-2	Q99999	F6TMD6
Q28F19	Q86UB2	Q96K75	Q02388	Q13114-2	Q15366-7	R4GN62	F6TNN3
Q28F54	Q86UP8-6	Q96KP4	Q02388-2	Q13202	Q15434	X6RAB3	F6TR13
Q28FH7	Q86UT6	Q96MB7	Q02763	Q13239-3	Q15468	A0JM72	F6UKW2
Q28FK3	Q86UU1-2	Q96MP5	Q02878	Q13325	Q15545	A0JM80	F6ULK4
Q28FR6	Q86UX7-2	Q96N46	Q02978	Q13360-2	Q15555	A0JMA2	F6UN55
Q28G26	Q86V20-2	Q96N67-3	Q03001-3	Q13418	Q15631	A0JP80	F6UP69
Q28G83	Q86VP3	Q96N76	Q03001-8	Q13433	Q15654	A0JP96	F6UPL5
Q28GE2	Q86VV8	Q96NL0-5	Q03111	Q13451	Q15758	A9JSB3	F6VSR1
Q28H98	Q86VZ6	Q96NX9-2	Q03181	Q13509	Q15884	A9JTN1	F6VTP5
Q28HF5	Q86W56-2	Q96P16	Q03181-3	Q13564	Q16585	A9JTS5	F6VTS8
Q28HM9	Q86WB0	Q96P20-5	Q04656-3	Q13571	Q16610	A9ULD5	F6VTU0
Q28I42	Q86XA9	Q96P47-4	Q04727	Q13574-4	Q16851	A9ULI6	F6VUF6
Q28IH8	Q86Y25	Q96PE2	Q05513-2	Q13769	Q92481-2	B7ZTW0	F6WQ39
Q28IU1	Q86YJ7-2	Q96PE3-2	Q05925	Q13797	Q92523	C9IZQ6	F6WQT8
Q28J76	Q86YZ4	Q96PE3-3	Q06210-2	Q13813	Q92535	C9J3P7	F6WSB3
Q32MZ4	Q96A19	Q96PM9-1	Q06323	Q13873-2	Q92537	C9J8H7	F6WU19
Q32MZ4-3	Q96A56	Q96PU5	Q06481-5	Q13905-2	Q92581-3	C9JIG9	F6WU78
Q32MZ4-4	Q96A65	Q96PU5-3	Q06643	Q14135-6	Q92625	Q92879-2	F6XM98
Q49MI3-4	Q96AA3	Q96PU8	Q07866-4	Q14165	Q92743	Q92896	F6XMW9
Q52MA5	Q96AG4	Q96PU8-3	Q07866-10	Q14166	Q92759	Q92993-2	F6XN24
Q53G59	Q96AJ1	Q96Q40	Q07960	Q14188	Q92800-5	Q93045	F6XNC2
Q53GS7	Q96BJ3	Q96Q89	Q08174-2	Q14195-2	Q92835-2	Q99081-2	F6XNK6

Lista del total de blancos predichos para miR-125a y miR-125b de *A. mexicanum* en regeneración y tejidos. Se muestran los entrez ID de cada gen predicho de la base de datos de uniprot ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)).

ID	ID	ID	ID	ID
F6YLC3	J3KT56	Q2M3X9-2	Q9HAU0	Q08345
F6YLQ4	J3QSW6	Q2M218	Q9HAV4	Q08380
F6YLZ6	K7EIG7	Q2M243	Q9HAV7	Q08945
F6YMG6	K7EJL4	Q2Y0W8-5	Q9HBD4	Q09472
F6YMI5	K7EJV5	Q3KQV3	Q9HBF4	Q09666
F6ZI32	O14497-3	Q5T6C5	Q9NUQ3	Q14197
F6ZIE4	O14593	Q5T7N3	Q9NUQ6-4	Q14289-2
F6ZJU1	O14595	Q5T8T8	Q9NUV9	Q14435
F6ZK05	O14610	Q5T9H5	Q9NV06	Q14451
F6ZK88	O14733-3	Q5T011	Q9NVM4	Q14498-2
F7A570	O60427	Q6DJ42	Q9UBB5	
F7A767	O60462-6	Q6DJ66	Q9UBS8	
F7A774	O60701	Q6DJS0	Q9UBY8	
F7AB54	O60844	Q6EMB2	Q9UDY8-2	
F7ABT6	O60861-1	Q6GL10	Q9UEE5	
F7BL46	O96020	Q6STE5	Q9UNQ2	
F7BLQ9	POC7M8	Q6TDU7-4	Q9UNX4	
F7BM85	POC8Y7	Q6UB98-2	Q9UNZ2	
F7BMD3	POCK96	Q6UN15-3	Q9UP65-2	
F7BMU3	P0DMC3	Q6UWV2	Q9UPQ3	
F7CEW4	P13349	Q7Z3U7-5	Q24JQ0	
F7CFG5	P13473-2	Q7Z5K2	Q28BY1	
F7CGD7	P13497	Q7Z5L2-2	Q28C17	
F7CGH6	P13639	Q7Z7B0	Q28C91	
F7CI44	P13647	Q7Z7F0	Q28CC9	
F7DBP0	P23467	Q8N8M0	Q58WW2	
F7DBY3	P23468-2	Q8N8N0	Q58WW2-3	
F7DC30	P25189-2	Q8N8Z6-2	Q59EK9	
F7DC69	P25800	Q8N184-1	Q63HR2-5	
F7DCI4	P26045	Q8N841-2	Q66IK1	
F7E1L4	P43088	Q8TF05-2	Q96BZ9	
F7E1R2	P43235	Q8WUH2	Q96DC9	
F7E2C9	P43405-2	Q8WUM0	Q96DF8	
F7E4C0	P45983-3	Q8WUN7	Q96E22	
F7E6J1	P45983-4	Q8WV35	Q96F46	
F7ETN4	P55786	Q9BYW2	Q96QK1	
F7EUG4	P57772	Q9BYZ6-2	Q96RE9-3	
F7EV03	P59046	Q9BZ23-3	Q96RL7	
F8VPL6	P61129	Q9BZD2	Q96RL7-3	
F8VRH5	P61236-2	Q9BZH6	Q96RT8	

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA FAMILIA miR-125 EN  
REGENERACIÓN DE EXTREMIDAD DE *Ambystoma mexicanum*

Tesis que presenta

Adan Giovanni Gómez Landin

Director de tesis: Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez

Firma del Comité Evaluador

Dra. Gertrud Lund:

Dr. Raúl Álvarez Venegas:

En Irapuato, Gto.      Febrero del 2016