

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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Participación de la reparación del ADN mediante recombinación homóloga
durante la regeneración de extremidades en *Ambystoma mexicanum*”**

T E S I S

Que presenta

M. EN C. ULISES OMAR GARCÍA LEPE

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dra. María del Refugio Bermúdez Cruz

Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez

Ciudad de México

Febrero, 2022

DEDICATORIA

A mis papás

Por la vida, por la libertad y por el apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo recibido para poder desarrollar este proyecto. Número de beca #589716.

A mi tutora, Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, por permitirme explorar nuevos rumbos científicos, por la confianza, amistad y por estar siempre presente.

A mi tutor, Dr. Alfredo Cruz Ramírez, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo absoluto, por su confianza en el proyecto y en mí.

A la Dra. María Luisa Bazán, por su apoyo desinteresado, por su amistad y por ser un ejemplo de calidez y calidad humana.

A la Dra. Guadalupe Ortega, por su amistad, su consejo desinteresado y por acompañarme durante todo este tiempo.

A mis asesores, Dr. Luis Marat, Dr. Javier Hernández, Dr. Luis Kameyama, Dr. Jesús Chimal. Por sus comentarios, consejos y aportaciones al desarrollo de este proyecto.

A Annie Espinal, por su amistad, su apoyo experimental en este proyecto, por el cuidado del bioterio y por todos sus consejos y enseñanzas.

A Gabriela Mora, por su eficiencia y apoyo en todos los procesos administrativos.

A Israel Vázquez, por todo su apoyo técnico en el laboratorio y su amistad.

A Iván Galván, por todo su apoyo en microscopia confocal y su confianza.

A mi hermano Edgar, por su amistad y por siempre estar, a su manera.

A mis amigos del laboratorio por su amistad y apoyo, MaryTere, Fabiola, Esteban, Sara, Yareth, Charlie y Edwin.

A Irais, por su amistad, por las charlas científicas, por su ayuda en todos los aspectos, por todos los buenos momentos, por impulsarme a crecer y enfrentar mis miedos, por escucharme, comprenderme y ser paciente. Por traer a Canelita nuestras vidas. También por aceptar ser mi compañera de vida y mi equipo.

Contenido

Lista de figuras	1
Lista de abreviaturas	2
Resumen.....	3
Abstract	4
1. Introducción	5
1.1 Generalidades de <i>Ambystoma mexicanum</i>	5
1.2 Regeneración de extremidades.....	6
1.3 El genoma de <i>Ambystoma mexicanum</i>	9
1.4 Daño al ADN durante su replicación	10
1.5 Reparación del ADN mediante recombinación homóloga.....	11
1.6 La recombinasa Rad51	14
1.7 El complejo MRN.....	15
2. Antecedentes	19
3. Justificación	23
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivo general.....	24
5.1 Objetivos particulares	24
6. Estrategia experimental	25
7. Metodología	26
7.1 Análisis bioinformáticos	26
7.2 Construcción de los plásmidos de expresión	26
7.3 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	27
7.4 Ensayos de unión al ADN.....	28
7.5 Ensayos de actividad nucleasa	28
7.6 Cuantificación por PCR tiempo real (qPCR).....	29
7.7 Amputación de extremidades de ajolote y administración de fármacos	29
7.8 Colección y fijación de tejido	30
7.9 Ensayos de inmunolocalización fluorescente	30
7.10 Tinciones de hematoxilina y eosina (H y E).....	31
7.11 Tinción de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β gal).....	31
7.12 Microscopia y procesamiento de las imágenes	32
8. Resultados	32

8.1 Dominios conservados en Amex.RAD51 y Amex.MRE11	32
8.2 Clonación y expresión de las proteínas recombinantes.....	35
8.3 Interacción de Amex.RAD51 con ADN	36
8.4 Efecto de B02 en la interacción de Amex.RAD51 con ADN.....	39
8.5 Actividades bioquímicas de Amex.MRE11: interacción con ADN y actividad nucleolítica	40
8.6 Efecto de Mirina en la actividad nucleasa de Amex.MRE11	42
8.7 Análisis de los niveles de transcritos de Amex. <i>Rad51</i> y Amex. <i>Mre11</i> durante la regeneración	44
8.8 Efecto de los inhibidores B02 y Mirina a los 28 dpa	47
8.9 Efecto de los inhibidores B02 y Mirina durante la etapa de blastema medio	51
9. Discusión	54
10. Conclusiones.....	61
11. Bibliografía	63

Lista de figuras

Figura 1. Diferentes tipos de pigmentación en los ajolotes. Página 6.

Figura 2. Esquema de las etapas de regeneración. Página 9.

Figura 3. Obstáculos de la replicación del ADN. Página 11.

Figura 4. Representación gráfica del mecanismo de reparación por recombinación homóloga. Página 13.

Figura 5. Análisis *in silico* de las secuencias proteicas de Amex.RAD51 y Amex.MRE11. Página 34.

Figura 6. Clonación génica y expresión de proteínas recombinantes. Página 36.

Figura 7. Actividades bioquímicas de Amex.RAD51. Página 38.

Figura 8. EMSA inhibitorio con el fármaco B02. Página 40.

Figura 9. Actividades bioquímicas de Amex.MRE11. Página 42.

Figura 10. Inhibición de Amex.MRE11 con Mirina. Página 43.

Figura 11. Análisis de expresión y organización de experimentos *in vivo*. Página 46.

Figura 12. Metodología empleada para los experimentos *in vivo*. Página 48.

Figura 13. Monitoreo de la regeneración. Página 49.

Figura 14. Regeneración de extremidades a los 28 dpa. Página 51.

Figura 14. Inmunolocalización de Amex.RAD51, Amex.MRE11 y γ H2AX. Página 53.

Lista de abreviaturas

AEC - Capuchón epidérmico apical.

ATM - Ataxia telangiectasia mutada.

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol.

dpa - días post-amputación.

DDR - Respuesta al daño del ADN.

DMSO - Dimetil sulfóxido.

DSB - Ruptura de doble cadena.

EMSA - Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética.

EST - Etiqueta de secuencia expresada

GFP - Proteína verde fluorescente.

GO - *Gene ontology*.

H y E - Hematoxilina y eosina.

hpa - horas post-amputación.

HR - Recombinación homóloga.

LTR - *Long terminal repeats*.

MSA - Alineamientos de secuencias múltiples.

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*.

PBS - Buffer fosfato salino.

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa.

SA- β Gal - β -galactosidasa asociada a la senescencia.

SDS - dodecilsulfato de sodio.

SSB - Ruptura de cadena sencilla.

RPA - Proteína de replicación A.

WE - Epidermis de herida.

Resumen

Una de las características más notables de la salamandra *Ambystoma mexicanum* es su potencial regenerativo, ya que puede restaurar varios tejidos, órganos y estructuras como las extremidades. En este anfibio, la regeneración se consigue a través de epimorfosis, dependiendo en la formación del blastema, una masa de células progenitoras altamente proliferativas con capacidad de diferenciarse para recuperar las estructuras perdidas. Durante la regeneración, estas células aceleran el ciclo celular, hecho que implica duplicar su ADN en un menor tiempo; además, su genoma es intrínsecamente difícil de replicar debido a su longitud y composición, lo que lo expone a sufrir rupturas de doble cadena. En este contexto, analizamos la maquinaria implicada en la reparación de estos daños y su efecto en el proceso de regeneración. Identificamos dos componentes indispensables de la vía de reparación por recombinación homóloga: Mre11 y Rad51, los cuales fueron expresados en un sistema bacteriano, y su función bioquímica fue caracterizada a través de inhibidores específicos (Mirina y B02). Después de utilizar estos inhibidores *in vitro*, estudiamos sus efectos durante la regeneración de extremidades; estos se aplicaron en diferentes tiempos después de la amputación y posteriormente se colectaron los tejidos para realizar análisis histológicos. Al inhibir a Rad51 durante el proceso regenerativo, se observó un aumento en el número de células senescentes, a los 28 días post-amputación, concomitante con un ligero retraso en el área regenerada. Además, al emplear dicho inhibidor (B02) se pudieron observar problemas en la formación de estructuras internas de la extremidad. Interesantemente estos efectos no se replicaron con el inhibidor de Mre11, lo cual sugiere que estos daños al ADN podrían estarse reparando por una vía alternativa. Por otra parte, se analizó la presencia y comportamiento de Rad51 y Mre11 en la etapa de blastema medio (aproximadamente 12 días post-amputación), por medio de técnicas de inmunofluorescencia. En estos tejidos no se observaron cambios en la localización o expresión para ambas proteínas, sin embargo, los inhibidores provocaron un aumento en la señalización de rupturas de doble cadena (γ H2AX), como respuesta a la afectación de los mecanismos de reparación durante el proceso de regeneración.

Abstract

One of the most remarkable characteristics of the salamander *Ambystoma mexicanum* is its regenerative potential, as it is capable of restoring various tissues, organs and complex structures such as limbs. In this amphibian, regeneration is achieved through epimorphosis, which depends on the formation of the blastema, a mass of highly proliferative progenitor cells with the ability to differentiate and recover lost structures. During regeneration, these cells accelerate the cell cycle, which implies DNA duplication in a shorter time; moreover, their genome is inherently difficult to replicate due to its length and composition, thus being prone to suffer double-strand breaks. In this context, we analyzed the machinery involved in the repair of this damage, as well as its effect on the regeneration process. We identified two basic components of the homologous recombination repair pathway: Mre11 and Rad51, which were heterologously expressed in a bacterial system, and their biochemical function was characterized through specific inhibitors (Mirin and B02). Once the efficacy of these inhibitors was determined *in vitro*, we studied their effects during limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*, where they were applied at different time points after amputation and tissues were collected for histological analysis. By inhibiting the Rad51 protein during the regenerative process, an increase in the number of senescent cells was observed at 28 days post-amputation, accompanied by a slight delay in the regenerated area. In addition, when B02 inhibitor was used, several problems in the formation of internal structures of the limb were observed, as evidenced by hematoxylin and eosin staining. Interestingly, these effects were not replicated when using the Mre11 inhibitor, suggesting that this DNA damage may be being repaired by an alternative repair pathway. On the other hand, in order to investigate the presence and role of Rad51 and Mre11 at the mid blastema stage (approximately 12 days post-amputation), immunofluorescence assays were performed. In these tissues, no changes were observed in the localization or expression for both proteins; however, the inhibitors caused an increase in signaling of double-strand breaks (γ H2AX), in response to the impairment of repair mechanisms during the regeneration process.

1. Introducción

1.1 Generalidades de *Ambystoma mexicanum*

Ambystoma mexicanum, comúnmente llamado Axolotl (ajolote), es un anfibio perteneciente al orden de los Urodelos (también llamados Caudados) o anfibios con cola, en este orden se incluyen diez familias con un número extenso de especies que se encuentran principalmente en regiones del hemisferio norte del planeta. Los ajolotes pertenecen a la familia *Ambystomatidae*, género *Ambystoma*, el cual incluye aproximadamente 30 especies distribuidas desde el sur de Alaska hasta el sur de México. En nuestro país; específicamente en las montañas del centro de México, hay 17 especies de *Ambystoma* entre las cuales se encuentra *Ambystoma mexicanum*, endémico de las zonas lacustres de la Ciudad de México (Farkas & Monaghan, 2015; Shaffer, 1989).

Los ajolotes; a diferencia de la mayoría de los Urodelos, son neoténicos obligados, es decir, no experimentan un proceso de metamorfosis, a menos de que se les induzca artificialmente al añadir hormonas tiroideas al agua del estanque donde viven (Page et al., 2008). Por lo tanto, al crecer se desarrollan en adultos completamente acuáticos manteniendo características larvales, como sus branquias externas o la aleta dorsal a lo largo de su vida. Con base en la pigmentación de su piel se pueden diferenciar tres tipos de ajolotes (**figura 1**): a) silvestres, los cuales presentan un color moteado gris/café/verde oliva, en los cuales los melanóforos negros son el cromatóforo dominante en la adultez, mientras que los xantóforos amarillos son más abundantes en edad temprana (Frost, Epp, & Robinson, 1984); b) leucísticos (mutante blanca *d/d*), son el resultado de una mutación recesiva en un gen de pigmentación, su coloración particular los hace predilectos para estudios donde se utilicen tinciones histológicas o microscopía de fluorescencia, ya que los pigmentos del tipo silvestre pueden afectar negativamente estos análisis. c) albinos, los cuales carecen completamente de melanina y tienen una apariencia amarilla debido a la presencia abundante de xantóforos. Los ajolotes adultos leucísticos pueden diferenciarse de los albinos por sus ojos de color negro (Kumar, Simon, & Kumar, 2015).



Figura 1. Diferentes tipos de pigmentación en los ajolotes. Izquierdo, ajolote leucístico; centro, ajolote albino; derecha ajolote silvestre. Tomado de (Farkas & Monaghan, 2015).

1.2 Regeneración de extremidades

La regeneración de extremidades es un fenómeno por el cual, tras la amputación de cualquier extremidad, ocurre un complejo proceso de desarrollo que lleva a la formación de una nueva extremidad y a la recuperación de su función (Simon & Tanaka, 2013). Uno de los primeros estudios sobre regeneración en salamandras fue realizado por Lazzaro Spallanzani hace más de 200 años (Spallanzani, 1769). En él, se describe de manera extensa el notable proceso de regeneración de médula espinal, lo cual contribuyó importantemente al establecimiento de *A. mexicanum* como modelo idóneo para el estudio de este proceso. Actualmente, la regeneración de tejidos complejos; como lo son las extremidades, es el enfoque principal de los laboratorios que realizan investigación con este organismo (Farkas & Monaghan, 2015). En adición a su notable capacidad para regenerar extremidades completas,

el ajolote también puede restaurar partes del corazón, cola, mandíbula, columna vertebral, branquias y cerebro. Este proceso acontece sin la formación de cicatrices y con la completa restauración de una estructura o tejido funcional, además se sugiere que la regeneración puede ocurrir un número de veces indefinido sin pérdida de fidelidad y durante todas las etapas de la vida del animal (Farkas & Monaghan, 2015). Sin embargo y de manera interesante se observó que después de varias rondas consecutivas de regeneración, las extremidades se formaban más pequeñas con relación al tamaño del animal; además, varias de estas patas presentaron malformaciones de distintos tipos (Bryant et al., 2017)

En relación con las etapas que presenta el proceso de regeneración de extremidades en *A. mexicanum*, se han reportado varias clasificaciones sobre las etapas que presenta el proceso de regeneración de extremidades en *A. mexicanum*. Algunas de estas se basan en los procesos que acontecen a nivel macroscópico y que incluyen: el cierre de herida, morfogénesis y crecimiento. Otras se fundamentan en el cambio de los patrones de expresión génica y que pueden ser clasificados en tres fases temporales: temprana (0 - 12 h), media (24 – 168 h) y tardía (288 – 528 h) (Knapp et al., 2013). Por otra parte, existe una clasificación que fue publicada en 1976 y que incluye cambios morfológicos macroscópicos, así como procesos a nivel celular, las etapas son: cierre de la herida, desdiferenciación, brote temprano, brote mediano, brote tardío, paleta y crecimiento (Tank, Carlson, & Connelly, 1976). A pesar de que esta última clasificación ha sufrido diversas añadiduras y modificaciones a consecuencia de los avances más recientes, sigue vigente debido a que engloba los principales procesos que ocurren durante la regeneración.

El primer paso en la regeneración de tejidos (dentro de la etapa de cierre de la herida) es la formación de la epidermis de herida (WE, por sus siglas en inglés), la cual se forma por migración de queratinocitos sobre la extremidad cortada (S. Roy & Levesque, 2006). Posteriormente, mediante proliferación y migración celular se genera una estructura conocida como capuchón epidérmico apical (AEC, por sus siglas en inglés). En la etapa de desdiferenciación se lleva a cabo la activación de células progenitoras. El término activación engloba la proliferación y movilización de

células troncales de adulto, así como la desdiferenciación de algunos tipos celulares. En específico, se ha observado la activación de células Pax7⁺, las cuales están involucradas en la regeneración de tejido muscular, así como la activación de células troncales neuronales Sox2⁺ cuando el proceso involucra la regeneración de la médula espinal (Rodrigo Albors et al., 2015; Sandoval-Guzman et al., 2014). Por otra parte, la desdiferenciación de células terminales no proliferativas también juega un papel relevante, ya que estas son reprogramadas para pasar a células progenitoras multipotentes (Gerber et al., 2018). Posteriormente, estas células activadas se acumulan en la punta del muñón donde proliferan y se desarrolla una estructura conocida como blastema, la unidad morfológica y funcional en este tipo de proceso regenerativo (Haas & Whited, 2017). Por lo tanto, las células del blastema poseen bastante plasticidad para pasar de ser células de tejido adulto quiescente a células altamente proliferativas que pueden formar nuevos segmentos de una extremidad, incluyendo huesos, músculos, nervios y tejido conectivo. Asimismo, las células del blastema retienen suficiente memoria posicional de su origen tisular (Simon & Tanaka, 2013). Una vez que el blastema ha alcanzado un tamaño crítico, su estructura bulbosa se aplana en la etapa de paleta, las futuras células del cartílago se fusionan y condensan, y se produce la diferenciación a los distintos tipos de tejidos (Stocum, 2019). Así finalmente, la extremidad recién generada adquiere una forma perfecta que es externamente indistinguible de la que se perdió. Es importante destacar que las extremidades se regeneran a la escala correcta, independientemente del tamaño o la edad del animal. Al final del proceso, toda la extremidad regenerada se encuentra funcionalmente integrada con el sitio del corte original y con todo el cuerpo; revisado en (Haas & Whited, 2017). Los pasos descritos pueden observarse en la **figura 2**.

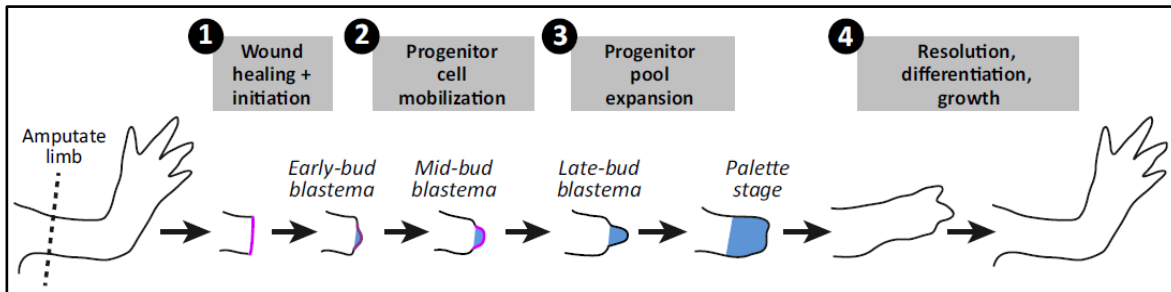


Figura 2. Esquema de las etapas de regeneración. 1) Sobre el plano de la amputación se muestra la epidermis de herida (WE) en rosa, 2) debajo del WE se empieza a formar el blastema (en azul) por la movilización de células activadas, 3) las células del blastema inician la proliferación, 4) las células comienzan a diferenciar y la extremidad continúa su crecimiento hasta alcanzar el tamaño adecuado. Modificado de (Haas & Whited, 2017).

1.3 El genoma de *Ambystoma mexicanum*

El genoma del ajolote se organiza en 14 cromosomas diploides ($2N = 28$) (Fankhauser & Humphrey, 1942). La secuenciación completa de su genoma implicó un desafío debido a su tamaño, 32-Gb (diez veces el tamaño del genoma humano), y a la presencia de un gran número de regiones repetidas. Se estima un aproximado de 23,251 genes codificantes de proteínas, un número similar al que presentan otros genomas de vertebrados, por lo que el resto de genoma corresponde a secuencias repetidas (65.6 %), dentro de las cuales, la mayor parte está representada por distintas clases de *long terminal repeats* (LTRs) y retrovirus endógenos. La presencia de muchos elementos repetidos contribuye a que el tamaño de los intrones tenga una media de 22,759 pb, número que es 13, 16 y 25 veces mayor al observado en humano (1,750 pb), ratón (1,469 pb) y rana (906 pb) respectivamente. Asimismo, se ha determinado una longitud de regiones inter-génicas 12 - 17 veces mayores que aquellas del genoma humano (Nowoshilow et al., 2018).

1.4 Daño al ADN durante su replicación

Las células progenitoras del blastema, de manera similar a las células troncales, son altamente proliferativas. Esta característica puede incrementar su susceptibilidad a daños al ADN e inestabilidad genómica (Vitale, Manic, De Maria, Kroemer, & Galluzzi, 2017). En este contexto, las mutaciones asociadas a la replicación son más comunes en células altamente proliferativas, debido a que se multiplican más frecuentemente que las células somáticas (Vassilev & DePamphilis, 2017). Durante el ciclo celular, antes de llegar a la mitosis, el ADN tiene que ser replicado de tal manera que la estabilidad genómica no se vea comprometida, esto implica replicar el genoma solamente una vez por célula y hacerlo con la velocidad y precisión adecuadas. Sin embargo, al mismo tiempo la célula pasa por diversas situaciones que pueden afectar el proceso de replicación; de lo contrario, podrían generarse rupturas en el ADN (Branzei & Foiani, 2010; Mladenov, Magin, Soni, & Iliakis, 2016). Los obstáculos que se presentan durante la replicación del ADN pueden dividirse en tres categorías: 1) aquellos relacionados con daño directo al ADN, provocado principalmente por elementos externos, como luz UV, radiación ionizante y agentes alquilantes (Lindahl, 1993), 2) aquellos que son producto del metabolismo celular normal, como las especies reactivas de oxígeno e hidrólisis, que inducen depurinación del ADN, oxidación de bases y enlaces covalentes entre las cadenas (*interstrand cross-links*), 3) elementos de riesgo relacionados a la topología natural del ADN, donde se incluyen las zonas de replicación tardía, proteínas de unión al ADN y el encuentro de la maquinaria de replicación del ADN con aquella encargada de la transcripción génica. Además, las secuencias del ADN por sí mismas pueden dificultar la replicación, debido a que se suelen organizar en estructuras complejas, entre ellas se encuentran las formas H, Z y S del ADN, estructuras cruciformes, horquillas y G-cuádruples. Normalmente estos patrones se forman en secuencias que contienen un gran número de repetidos, como di y trinucleótidos, repetidos directos e invertidos en tándem, microsatélites, pseudo genes y elementos transponibles (P. Liu, Carvalho, Hastings, Lupski, & development, 2012; Mirkin & Mirkin, 2007; Techer, Koundrioukoff, Nicolas, & Debatisse, 2017). Todos estos elementos descritos tienen la capacidad potencial de

detener la horquilla de replicación y finalmente generar rupturas de doble cadena (DSBs, por sus siglas en inglés) (Branzei & Foiani, 2010). La **figura 3**, resume algunos de estos elementos que pueden impedir el progreso de la replicación del ADN.

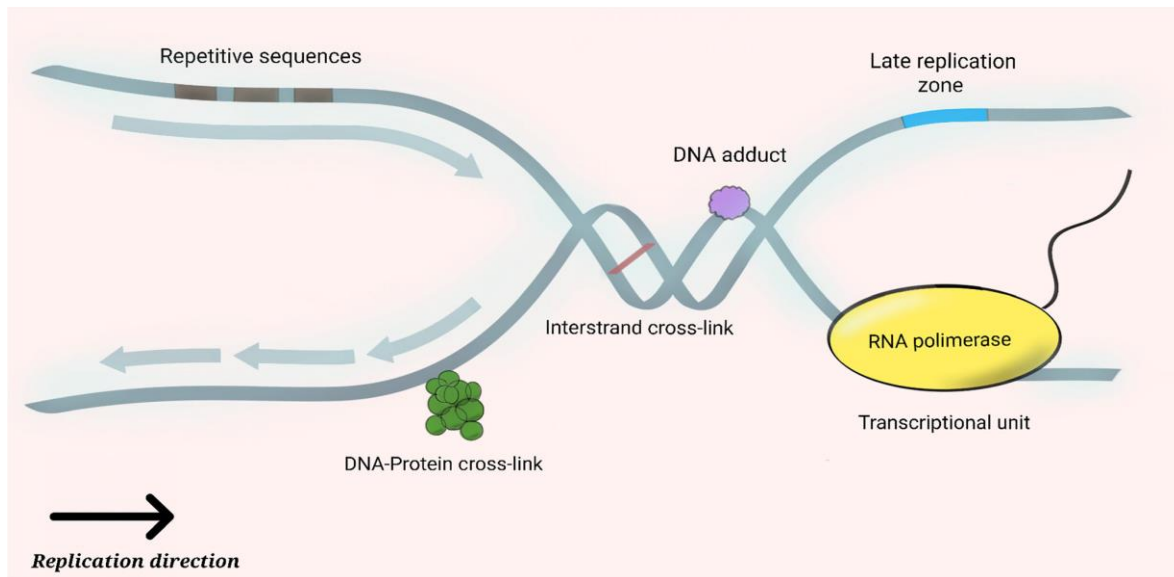


Figura 3. Obstáculos de la replicación del ADN. Varios impedimentos naturales pueden afectar la maquinaria de replicación provocando un estancamiento y posteriores rupturas del ADN. El encuentro con enlaces covalentes de ADN-proteína o entre las cadenas, aductos y unidades transcripcionales puede afectar a la replicación debido a su volumen o a la dificultad para separar las hebras. Por otro lado, la secuencia de ADN situada en repeticiones y zonas de replicación tardía pueden generar estructuras secundarias propensas a romperse cuando se replican. Tomado de (García-Lepe, Cruz-Ramírez, & Bermúdez-Cruz, 2021).

1.5 Reparación del ADN mediante recombinación homóloga

A lo largo de la evolución, las células han desarrollado dos mecanismos principales para detectar y reparar las DSBs. Uno de ellos es la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés), una vía poco confiable que actúa principalmente en la fase G1 del ciclo celular. NHEJ se basa en la adición y delección

de bases en el lugar del daño, lo que resulta en el restablecimiento de la integridad del ADN a expensas de alteraciones en la secuencia (Stinson & Loparo, 2021). Por otro lado, la recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés) se basa en el uso de la cromátida hermana para el proceso de reparación. Por lo tanto, la reparación se restringe a las fases S y G2 del ciclo celular para obtener la información perdida en el DSB y restablecer la integridad del ADN, así como la secuencia de este (Mladenov et al., 2016; Sun, McCorvie, Yates, & Zhang, 2020).

La HR es un mecanismo muy intrincado y altamente conservado en la evolución, ya que opera con los mismos principios desde bacterias hasta los humanos, sin embargo, a pesar de ser un mecanismo conservativo, se ha observado cierto grado de permisividad entre la secuencia dañada y la donadora para la recombinación, en la cual puede existir hasta 1 % de divergencia antes de que este proceso se vea suprimido, lo anterior en células madre embrionarias murinas (Elliott & Jasin, 2001; Larocque & Jasin, 2010). Los extremos de un DSB son reconocidos y procesados para generar salientes 3' de ADN de cadena sencilla, a través de un proceso llamado resección sobre el extremo 5', el cual involucra a varias proteínas entre las que se incluyen aquellas que comprenden el complejo MRN, así como CtIP y Exo1 (Mladenov et al., 2016). Adicionalmente, el complejo MRN está involucrado en el reclutamiento de la cinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM). Una vez en el sitio de daño ATM puede promover la inducción de los puntos de control del ciclo celular, activar apoptosis, senescencia o influir en la reparación del ADN, esto último a través de la fosforilación de la histona H2AX quien a su vez empieza la señalización y reclutamiento de factores de reparación (Stracker & Petrini, 2011).

A los extremos resectados se une de inmediato la proteína de replicación A (RPA, por sus siglas en inglés), la cual tiene la capacidad de unirse al ADN de cadena sencilla. La unión de RPA al ADN regula negativamente la unión de RAD51, la principal recombinasa en este mecanismo. Por lo tanto, varias proteínas mediadoras (RAD52, BRCA2, RAD52 y parálogos de RAD51) participarán en el desplazamiento de RPA y subsecuente formación del filamento de RAD51 y ADN. Otro elemento destacable durante el proceso es la proteína BRCA1, que de manera conjunta con

PALB2 participan promoviendo el reclutamiento de diversas proteínas al sitio de la ruptura. Una de estas proteínas es BRCA2, la cual se encarga de dismantelar la estructura heptamérica nativa de RAD51 y facilita su unión al ADN (Mladenov et al., 2016; Prado, 2018). Una vez establecido el proteo-filamento de RAD51, este realizará la búsqueda de homología y la invasión de cadenas en la que los extremos 3'OH serán utilizados para la síntesis de la cadena de ADN por la polimerasa y proteínas asociadas, formando cadenas entrecruzadas denominadas estructuras de Holliday (Sung & Klein, 2006). La resolución de estas estructuras se lleva a cabo por un grupo de proteínas llamadas resolvasas, y los productos cruzados o no cruzados pueden emerger dependiendo de cuál de las cadenas es digerida (Mladenov et al., 2016). El esquema general de este proceso se ilustra en la **figura 4**.

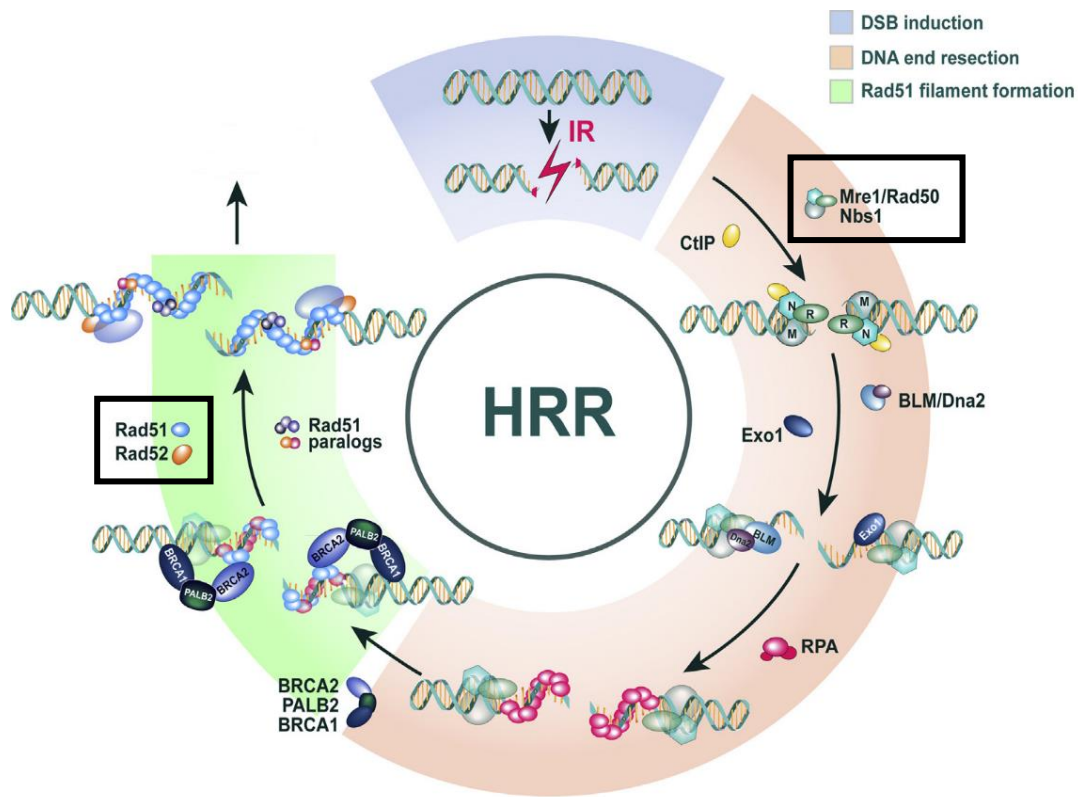


Figura 4. Representación gráfica del mecanismo de reparación por recombinación homóloga. El complejo MRN, así como Rad51 se señalan en un recuadro. Modificado de Mladenov *et al.*, (Mladenov et al., 2016).

1.6 La recombinasa Rad51

Rad51 lleva a cabo las mismas actividades específicas que su homólogo bacteriano RecA, entre las que se incluyen: unión a ADN de cadena sencilla y cadena doble, a través de su dominio (hélice-pinza-hélice, HhH); hidrólisis de ATP dependiente de ADN, empleando sus dos dominios Walker A y Walker B (WA y WB); oligomerización de unidades de Rad51, a través de su dominio BRC; formación de filamentos núcleo-proteicos; apareamiento homólogo de cadena sencilla con un dúplex de ADN e intercambio de cadena (Benson, Stasiak, & West, 1994; Gupta, Bazemore, Golub, & Radding, 1997). Estas actividades son necesarias para realizar su función en la búsqueda de secuencias homólogas y posterior reparación.

Además de su papel esencial en la reparación de rupturas de doble cadena, Rad51 también está involucrada en la replicación del ADN, donde se requiere para prevenir la acumulación de fracciones de ssADN en las horquillas de replicación y detrás de ellas. Estos huecos se generan por el desacoplamiento extendido en la síntesis de la cadena delantera y la atrasada. Por lo tanto, Rad51 tiene un papel específico en la prevención de lesiones del ADN asociadas con la replicación, donde protege al ADN naciente de degradación nucleolítica (Hashimoto, Ray Chaudhuri, Lopes, & Costanzo, 2010).

Rad51 no es esencial para levadura, sin embargo, se requiere para la proliferación celular en vertebrados, como fue observado por Tsuzuki *et al.* (1996), al generar una mutante nula de Rad51 en células madre embrionarias de ratón y no obtener descendencia para el homocigoto de la mutación después de realizar la pre-implantación (Tsuzuki et al., 1996). Adicionalmente, Sonoda *et al.* (1998), generaron una mutante nula de Rad51 en células DT40, las cuales además contenían un transgén para la expresión de hsRad51, que al ser inhibido provocaba un arresto

celular en metafase, así como la formación de rupturas cromosómicas (Sonoda et al., 1998). La evidencia anterior sugiere un papel esencial para el mantenimiento de la integridad genómica y la supervivencia celular, lo cual ha complicado el estudio de Rad51 a través de mutaciones específicas.

En los años 2011 y 2012, Huang *et al.*, desarrollaron un compuesto capaz de inhibir a Rad51. La finalidad de esta investigación era encontrar moléculas inhibitorias con fines terapéuticos, que pudieran ser utilizadas como co-tratamiento en enfermedades oncológicas (Huang, Mazina, Zentner, Cocklin, & Mazin, 2012; Huang et al., 2011). El uso de estos compuestos también resulta ventajoso en la investigación, ya que generar organismos que no expresen a Rad51 resulta en letalidad. Este compuesto, denominado B02, tiene la capacidad de inhibir la unión de HsRad51 a ADN de cadena sencilla y doble, consecuentemente impidiendo la formación del filamento y el intercambio de cadenas. Adicionalmente, B02 fue usado en células humanas (HEK) donde se observó una disminución en la formación de focos de HsRad51 posterior a una exposición de radiación ionizante, además, al transfectar las células con un vector que permite realizar recombinación homóloga para restaurar un gen de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), detectaron una disminución en el número de células positivas en una manera dosis dependiente (Huang et al., 2012; Huang et al., 2011). Es importante destacar que este inhibidor también ha sido probado en ensayos *in vivo*. B02 fue co-administrado con cisplatino en xeno-injertos de ratón, donde demostró mejorar significativamente el efecto terapéutico del cisplatino en las células tumorales (Huang & Mazin, 2014).

1.7 El complejo MRN

El complejo MRN es una maquinaria molecular multifacética, crítica para procesos biológicos que detectan y reparan rupturas de doble cadena (Hopfner, Putnam, & Tainer, 2002). El complejo MRN ha sido implicado en todos los aspectos del procesamiento de DSBs, desde la detección inicial hasta el desencadenamiento de vías de señalización que facilitarán la reparación, además MRN está presente en

las horquillas de replicación y telómeros, donde desempeña papeles clave en la prevención de DSBs. Por lo tanto, el complejo MRN realiza tres funciones principales críticas: 1) unión al ADN y procesamiento o resección, 2) inmovilización del ADN para tender un puente sobre el mismo a distancias cortas y largas, y 3) activación de la respuesta a DSBs y control de vías de señalización (Williams, Lees-Miller, & Tainer, 2010).

El complejo MRN está constituido por la proteína de recombinación meiótica 11 (Mre11), Rad50 y *Nijmegen breakage syndrome 1* (Nbs1; también conocido como nibrina), o su homólogo en levadura Xrs2. El complejo de tres elementos a su vez se homodimeriza para llevar a cabo sus funciones. Este complejo censa los DSBs y controla la respuesta al daño del ADN (DDR, por sus siglas en inglés), reclutando y modulando la activación de ATM. La proteína Mre11 utiliza sus dominios de fosfodiesterasa para realizar su actividad exonucleasa 3'-5' y endonucleasa de ADN de cadena sencilla, procesos dependientes del cofactor manganeso (revisado en (Symington, 2002)) y de la unión e hidrólisis de ATP (Mockel, Lammens, Schele, & Hopfner, 2012), además Mre11 contiene dominios específicos para homodimerizar y para interactuar con el ADN (Park, Chae, Kim, & Cho, 2011). Se ha determinado que Mre11 está involucrado en los primeros pasos de la resección, ya que una vez que el complejo se une al ADN, CtIP estimula la actividad endonucleasa de Mre11 para que realice un corte en una sola cadena (endonucleasa), desde ese punto la resección por Mre11 continúa con su actividad exonucleasa 3'-5' hacia el sitio de la ruptura, sin embargo, para poder generar los extremos 3' libres necesarios para la reparación, se necesita la actividad exonucleasa 5'-3' de CtIP y Exo1 (Lafrance-Vanasse, Williams, & Tainer, 2015; Mladenov et al., 2016). En el caso de Rad50, una proteína perteneciente a la familia de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC, por sus siglas en inglés), se ha propuesto una función estructural en adición a sus actividades de ATPasa y unión a ADN, ya que las configuraciones observadas de la estructura cristalizada sugieren que el dímero de Rad50 podría unirse a otro dímero de un complejo diferente, formando un puente entre dos extremos del ADN (Kinoshita, van der Linden, Sanchez, & Wyman, 2009; Lafrance-Vanasse et al., 2015). Como parte del

complejo MRN, Nbs1 (o Xrs2 en levadura) es la encargada de interactuar con ATM, de hecho, el segmento de interacción de Nbs1 con Mre11 se encuentra adyacente al motivo de interacción con ATM, de tal manera que la interacción de Nbs1 y ATM es capaz de regular la actividad de Mre11. Asimismo, se ha determinado que la conformación de Mre11 y Rad50 en el complejo, pueden ser detectadas por Nbs1, lo cual se traduce en el reclutamiento de ATM para su activación.

Como se abordó anteriormente, durante la replicación del ADN, se pueden originar DSBs y también rupturas de cadena sencilla (SSB, por sus siglas en inglés), como consecuencia de horquillas de replicación estancadas o por regresión de estas. En este contexto, el complejo MRN y ATM promueven la resección de las DSBs, permitiendo la unión de RPA y activación de las cinasas ATR y CHK1, que potencian la respuesta al daño y promueven la formación del filamento de Rad51, permitiendo así que la replicación continúe (Jazayeri et al., 2006; Myers & Cortez, 2006).

Aunque las mutantes nulas para *mre11*, *rad50* y *xrs2* de levadura son viables, Mre11, Rad50 y Nbs1 son esenciales para la viabilidad de líneas celulares de vertebrados y para el desarrollo temprano de embriones murinos (revisado en (Symington, 2002). Asimismo, en la línea celular de gallina (DT40); en la cual se le eliminaron ambos alelos de *mre11* y se añadió un transgén para expresar Mre11 bajo un promotor inducible con tetraciclina, se observó que al regular negativamente el transgén había una reducción rápida de Mre11, así como una radio sensibilidad incrementada, aumento en los niveles de rupturas cromosomales espontáneas, arresto del ciclo celular en la fase G2 y eventual muerte celular (Yamaguchi-Iwai et al., 1999). De la misma manera, la eliminación de Mre11 con anticuerpos en extractos de *Xenopus laevis*, resultó en síntesis aberrante de ADN acompañada con la formación de DSBs (Costanzo et al., 2001). Los estudios anteriores sugieren un papel esencial para Mre11 en la reparación de lesiones generadas durante la fase S en vertebrados (Symington, 2002).

Al igual que para Rad51, existe un compuesto que inhibe a Mre11, el cual también fue desarrollado con fines terapéuticos en tratamiento oncológicos. Este fármaco, denominado Mirina, inhibe la actividad exonucleasa 3'-5' de HsMre11, sin alterar

su interacción con los demás elementos del complejo (Rad50 y Nbs1), ni su interacción con el ADN. Adicionalmente se encontró que Mirina inhibe la activación de ATM, el *checkpoint* G2/M y la reparación mediada por HR en células de mamífero (Dupre et al., 2008). Mirina también ha sido utilizado en ensayos *in vivo*, donde se administró para tratar xenoinjertos de neuroblastoma en ratones, resultando en un fuerte deterioro del crecimiento tumoral, asociado con una acumulación de P53 y posterior muerte celular (Petroni et al., 2018).

2. Antecedentes

A la fecha, son escasas las investigaciones que han estudiado los mecanismos de reparación del ADN en *Ambystoma mexicanum*, sin embargo la correspondencia entre la regeneración de tejidos y la estabilidad genómica se propuso recientemente (Garcia-Lepe et al., 2021). Esta relación se refuerza con algunos estudios de expresión génica llevados a cabo principalmente con la tecnología de microarreglos, donde se ha observado un incremento en la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la integridad genómica. El primer estudio de este tipo fue realizado por Monaghan *et al.*, quienes diseñaron un chip de microarreglos (Affymetrix GeneChip) con 4,844 sondas, el cual les permitió analizar la expresión génica durante la etapa temprana de regeneración de médula espinal (primeros 7 días) (Habermann et al., 2004). Dentro de las centenas de genes que mostraron un cambio de expresión significativo, solo RPA2 y CHEK1 están involucrados en la reparación del ADN.

En otra investigación, conducida por Habermann *et al.* (2004), se obtuvieron dos bibliotecas de ADNc: una procedente del tubo neural de embrión, etapa 18-22 y la segunda con tejido obtenido de blastema de cola seis días post-amputación (dpa), generando 17,352 etiqueta de secuencia expresada (ESTs, por sus siglas en inglés), de las cuales se ensamblaron 6,377 *contigs*. El análisis de comparación de secuencia reveló homología significativa con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). El análisis posterior de estos homólogos a través de *Gene Ontology* (GO) permitió asignar la participación de los genes en importantes procesos celulares y de desarrollo, incluyendo: metabolismo y modificación de proteínas; metabolismo, transporte intracelular; ciclo celular/proliferación; metabolismo de RNA; señalización intracelular y metabolismo de ADN/reparación, este último grupo constituye apenas el 5% del total (Habermann et al., 2004).

En una investigación realizada por Voss *et al.*, se estudió la expresión génica durante la regeneración de extremidad anterior de ajolote mediante microarreglos. Posterior a la amputación, se recolectaron muestras de tejido (1 mm) heterogéneo

(epidermis, epidermis de herida, músculo, hueso, cartílago, axones, nervios, vasos sanguíneos, tejido conectivo, tejido graso, matriz extracelular y blastema) de la porción distal de la extremidad, en 20 distintos puntos de tiempo (Voss et al., 2015). A dichas muestras se les extrajo ARN (10 replicados) para realizar la estimación de expresión génica, empleando el GenChip Amby002 de Affymetrix previamente reportado por Huggins *et al.*, (Huggins et al., 2012). En consecuencia, se obtuvieron aproximadamente 20,000 perfiles de expresión, los cuales fueron depositados en el sitio Sal-Site (www.ambystoma.org). Entre los genes que muestran un aumento en su expresión durante el proceso de regeneración, y que están involucrados en la reparación del ADN se encuentran: Rad51, Mre11, Rad50, BLM, RPA1, BRCA1, Rad52, Ku70, Lig1 y Lig4.

Por otra parte, en 2016, Rost *et al.*, realizaron un estudio en el cual analizaron la proliferación celular en espacio y tiempo, e identificaron una zona altamente proliferativa durante la regeneración de médula espinal. Así mismo, por medio de rastreo de células marcadas lograron cuantificar la afluencia celular en la regeneración y empleando modelamiento matemático integraron los conjuntos de datos cuantitativos de proliferación celular, activación de células troncales neuronales y afluencia celular para predecir crecimiento tisular. Finalmente, su modelo demostró que la afluencia celular, así como la activación de células madre neuronales juegan un papel menor, por otra parte, la aceleración del ciclo celular es el principal conductor de la regeneración de médula espinal en ajolotes (Rost & Rodrigo Albers, 2016). Posteriormente, se demostró que la aceleración en el ciclo celular se debía a un acortamiento en las fases G1 y S (Costa, Otsuki, Albers, Tanaka, & Chara, 2021).

En un estudio realizado en el 2015, se analizó la aparición de células senescentes durante la regeneración de extremidades en las salamandras *Notophthalmus viridescens* y *Ambystoma mexicanum* (Maximina H. Yun, Davaapil, & Brockes, 2015). La senescencia celular es normalmente reconocida como un proceso regulatorio en el cual las células dejan de proliferar como respuesta a distintos estímulos nocivos y así evitar la propagación de estos daños, que podrían en última

instancia afectar la homeostasis tisular. En este contexto, los principales incentivos para producir senescencia celular son la erosión de telómeros, daño oxidativo, activación de oncogenes y daño al ADN (M. H. Yun, 2018). Durante el estudio referido se observó un incremento en estas células, en específico durante la etapa de blastema medio, en el cual alcanzan su número máximo, después de esta etapa las células senescentes disminuyen conforme avanza la regeneración, siendo prácticamente indetectables en el tejido regenerado (Maximina H. Yun et al., 2015). Posteriormente, se determinó que la eliminación de las células senescentes durante la regeneración es un mecanismo mediado por macrófagos, ya que la supresión de estas células evitó la reducción de las células senescentes (Maximina H. Yun et al., 2015). Este resultado indica que las células senescentes son eficientemente eliminadas en el proceso regenerativo a través de un mecanismo mediado por macrófagos, sin embargo, no se determinó si estas son originadas por algún tipo de daño al ADN.

Más recientemente, en una investigación realizada en el 2020, se analizaron los patrones de expresión para genes implicados en varias vías de reparación del ADN (Sousounis et al., 2020). Los datos de expresión se tomaron de bases de datos de microarreglos y secuenciación del ARN publicadas previamente (Stewart et al., 2013; Voss et al., 2015). En este análisis se observó que aproximadamente en el día 14 post-amputación hay un incremento en la expresión genes involucrados en las vías de reparación por escisión de bases, reparación por escisión de nucleótidos, reparación de *mismatches*, recombinación homóloga y unión de extremos no homólogos. Adicionalmente, a través de experimentación se demostró que el marcador de DSBs, la histona fosforilada (γ H2AX), se acumula cuando la regeneración de extremidades está en proceso (aproximadamente a 14 dpa). En concordancia que esta observación, también se determinó el aumento en la expresión del correspondiente gen de la histona (*h2afx*) (Sousounis et al., 2020). Estos datos sugieren fuertemente que el ADN se daña durante el proceso regenerativo, y que aparecen rupturas dobles en el material genético, lo cual correlaciona perfectamente con el incremento en las vías de reparación observada en el análisis de expresión.

La regeneración de tejidos en el ajolote está caracterizada por una amplia activación y proliferación celular; esto se correlaciona con la alta transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular y con los reportes sobre la aceleración de este (Espinal-Centeno, Dipp-Alvarez, Saldana, Bako, & Cruz-Ramirez, 2020; Rost & Rodrigo Albors, 2016). En el mismo sentido, es importante mencionar que *A. mexicanum* posee varias características notables que la colocan en una situación desafiante cuando se refiere a la replicación del ADN, en el contexto de la regeneración de tejidos (revisado en (Garcia-Lepe et al., 2021)), ya que como se mencionó anteriormente, posee un genoma gigante, un gran número de secuencias repetidas, las cuales tienen que ser replicadas fidedignamente en un tiempo reducido, (Costa et al., 2021; Nowoshilow et al., 2018; Rost & Rodrigo Albors, 2016). Estas características presentan problemas para que el genoma del ajolote se pueda replicar y tenga susceptibilidad para sufrir daños (Branzei & Foiani, 2010; Mladenov et al., 2016). En este contexto, es importante que la herencia de la información genética se realice de manera fidedigna; a través de las divisiones celulares consecutivas, para asegurar una regeneración y funcionalidad tisular adecuadas. En consecuencia, el ajolote debe estar dotado de sistemas moleculares especializados y finamente coordinados para poder mantener la estabilidad del genoma durante su replicación, y a lo largo de la alta proliferación en el proceso de regeneración de tejidos.

El presente trabajo se propuso como objetivo determinar la relevancia del mecanismo de reparación por HR durante la regeneración de extremidades en el ajolote. Los resultados obtenidos se dividen en dos partes: i) la primera se centra en el análisis *in silico* e *in vitro* de dos elementos fundamentales en la HR: Amex.MRE11, la nucleasa implicada en la resección del ADN durante los primeros pasos del proceso de reparación, y Amex.RAD51, la principal recombinasa implicada en la búsqueda de homología en las etapas finales de la HR. Las actividades bioquímicas de ambas proteínas fueron corroboradas *in vitro* y la identidad de dichas proteínas fue verificada al emplear los inhibidores específicos de cada una. ii) La segunda parte examina la implicación de estas dos proteínas en el curso de la regeneración de las extremidades *in vivo*, utilizando los inhibidores

químicos mencionados. Con los resultados *in vitro*, hipotetizamos que ambos inhibidores provocarían un aumento de DSBs cuando se aplicaran consecutivamente en la fase de blastema medio, lo cual se confirmó al observar que la inhibición de Amex.RAD51 provocó un aumento en el número de células senescentes durante la etapa de rediferenciación, efecto que no se observó con la inhibición de Amex.MRE11 en la misma etapa. Asimismo, se observó un ligero retraso en la regeneración de la extremidad con la inhibición de Amex.RAD51. Por otra parte, en la etapa de blastema medio, se observó que la inhibición de ambas proteínas provocaba un aumento en la señalización de DSBs.

3. Justificación

Debido a que durante el proceso de regeneración de extremidades de *Ambystoma mexicanum* existe un aumento en la proliferación y aceleración del ciclo celular, aunado al gran tamaño de su genoma, este organismo debe contar con mecanismos de mantenimiento de la integridad genómica los cuales le permiten regenerar adecuadamente la extremidad faltante. Así se propuso llevar a cabo, durante el proceso de regeneración, la caracterización bioquímica de dos elementos Amex.RAD51 y Amex.MRE11 los cuales son indispensables para la señalización y reparación del ADN a través de recombinación homóloga, y posteriormente se evaluó su participación en el proceso de regeneración de extremidades vía inhibición *in vivo*.

4. Hipótesis

- Si las proteínas Amex.RAD51 y Amex.MRE11 poseen las actividades bioquímicas específicas reportadas en homólogos de otros organismos, entonces estas participarán en el proceso de reparación del ADN durante la regeneración de extremidades en *Ambystoma mexicanum*.
- Si dichas proteínas se inhiben *in vivo* durante la regeneración de extremidades, este proceso se verá afectado.

5. Objetivo general

Caracterizar bioquímicamente a las proteínas Amex.RAD51 y Amex.MRE11 (*in vitro*) y evaluar su participación durante la regeneración de extremidades en *Ambystoma mexicanum* (*in vivo*).

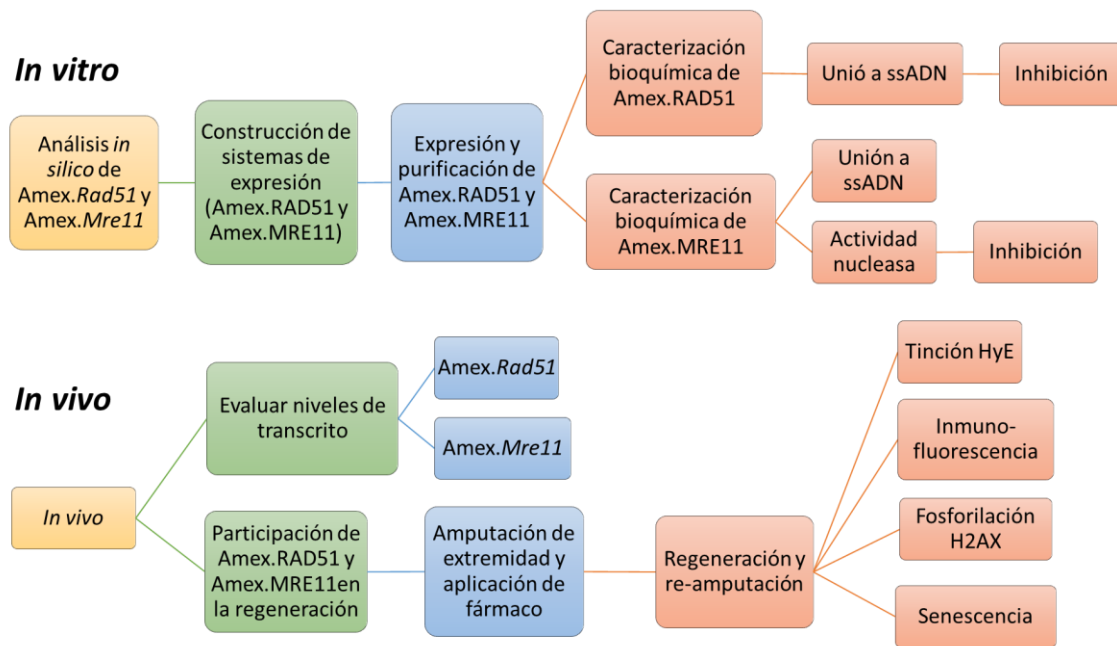
5.1 Objetivos particulares

1. Realizar el análisis *in silico* de los genes Amex.*Rad51* y Amex.*Mre11*.
2. Construir los sistemas de expresión heteróloga para Amex.RAD51 y Amex.MRE11.
3. Expresar y purificar las proteínas recombinantes Amex.RAD51 y Amex.MRE11.
4. Caracterizar bioquímicamente a Amex.RAD51.
 - 4.1 Evaluar la unión a ADN.
 - 4.2 Evaluar la inhibición de la unión a ADN por el fármaco B02.
5. Caracterizar bioquímicamente a Amex.MRE11.
 - 5.1 Evaluar la unión a ADN.
 - 5.2 Evaluar la actividad nucleasa.
 - 5.3 Evaluar la inhibición de la actividad nucleasa por el fármaco Mirina.
6. Determinar los niveles de transcrito de los Amex.*Rad51* y Amex.*Mre11* durante el proceso de regeneración.
7. Estudiar la participación de Amex.RAD51 y Amex.MRE11 vía inhibición durante la regeneración de extremidades.
 - 7.1 Analizar las afectaciones a la regeneración a nivel histológico (tinción con H & E).
 - 7.2. Determinar los patrones de senescencia celular.

7.3 Determinar la distribución sub-celular de las proteínas Amex.RAD51 y Amex.MRE11 a través de inmunofluorescencia.

7.4 Analizar la fosforilación de la histona H2AX como marcador de daño al ADN.

6. Estrategia experimental



7. Metodología

7.1 Análisis bioinformáticos

Las secuencias nucleotídicas de los genes *Rad51* y *Mre11* (de ahora en adelante mencionadas como *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11*, con base en la nomenclatura propuesta por (Nowoshilow, Fei, Voss, Tanaka, & Murawala, 2021) fueron obtenidas de bases de datos previamente publicadas (Caballero-Perez et al., 2018; Stewart et al., 2013) y del Gene and EST Database en la página web Sal-Site (<https://ambystoma.uky.edu/>). *Amex.Rad51* ID: I0121895, *name*: isotig118466, *Amex.Mre11* ID: I0200683, *name*: isotig197208. Las secuencias adicionales empleadas para realizar los alineamientos de secuencias múltiples (MSA) se obtuvieron mediante BLAST (Zhang, Schwartz, Wagner, & Miller, 2000), utilizando el homólogo correspondiente de *A. mexicanum* como *query*. El MSA se realizó con el *software* MAFFT (Katoh & Standley, 2013), y los resultados se visualizaron a través del programa ESPript (Gouet, Robert, & Courcelle, 2003). Para predecir los dominios funcionales, las secuencias aminoacídicas de *Amex.RAD51* y *Amex.MRE11* se escanearon con el *software* Conserved Domains del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Lu et al., 2020). Para obtener las estructurales tridimensionales, las secuencias se sometieron a I-TASSER (A. Roy, Kucukural, & Zhang, 2010) y posteriormente fueron alineadas con su homólogo humano a través de PyMOL.

7.2 Construcción de los plásmidos de expresión

Las secuencias codificantes completas de *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11* se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de ADNc procedente de tejido de extremidad en regeneración de *A. mexicanum*. Los sitios de restricción específicos se añadieron a los oligonucleótidos para facilitar el proceso de clonación.

GCTAGCATGGCCATGCAGGTGCAATA	3´	<i>Amex.Rad51</i>	directo	5´
GAGCTCTCAGTCTTTAGCATCTCCCACAC	3´,	<i>Amex.Mre11</i>	directo	5´
GCTAGCATGAGCTGCGGGAATACAAT	3´		y reverso	5´
GAGCTTTATCTTCGGTTTCTTCTTGAAGAAGC	3´.			Los productos de PCR

obtenidos se sub-clonaron en el vector pJet 1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific K1231) y posteriormente se escindieron con las endonucleasas *SacI* y *NheI*. Las secuencias génicas obtenidas se purificaron y clonaron en el plásmido de expresión inducible pET-100/D-TOPO[®] (Invitrogen K10001), empleando la ligasa de ADN T4 (NEB[®] Inc. M0202). Finalmente se generaron los plásmidos pET100-Amex.*Rad51* y pET100-Amex.*Mre11* (**figura 6**). Estos plásmidos le añaden a la proteína expresada una etiqueta de polihistidinas en el extremo amino terminal, la cual fue utilizada para detectar y purificar la proteína.

7.3 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Los plásmidos construidos fueron transformados en bacterias *Escherichia coli* cepa SoluBL-21[™] (amsbio C700200). Una colonia aislada se cultivó en medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina e incubado toda la noche a 37 °C. Este cultivo fue utilizado para inocular un segundo cultivo, el cual fue inducido con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM e incubado por 4 h a 37° C. El cultivo fue enfriado y se obtuvo el sedimento bacteriano mediante centrifugación. La pastilla obtenida se re-suspendió en solución de lisis (Tris-base pH 7.5 300 mM, NaCl 2 M, MgCl₂ 20 mM), se sonicó (12 ciclos de 5 s de actividad al 100 % de potencia, con intervalos de descanso de 35 s) y centrifugó (14,000 rpm por 35 min) para eliminar los residuos celulares. Se colectó el sobrenadante y se colocó en una columna cromatográfica que contenía perlas de agarosa HisPur[™] Ni-NTA superflow (Thermo Fisher Scientific 25215), se lavó con solución de lisis adicionada con imidazol a 50 mM, y se eluyó con una solución de imidazol a 300 mM. La solución eluida se concentró mediante centrifugación, haciendo uso de columnas Amicon[®] Ultra-4 (Millipore UFC803024), posteriormente se cuantificó mediante el método colorimétrico de Bradford, empleando el reactivo concentrado Protein Assay Dye (BIO-RAD 500-0006). La solución concentrada de proteína purificada se utilizó para inmunodetección en fase sólida. Se empleó el anticuerpo primario anti-polihistidinas (Sigma-Aldrich H1029) a una dilución 1:1000, y el anticuerpo secundario anti-ratón igG H+L) conjugado con HRP (Promega W4021).

7.4 Ensayos de unión al ADN

En estos ensayos, concentraciones crecientes de la proteína purificada (Amex.RAD51 o Amex.MRE11) se incubaron con un oligonucleótido fluorescente de cadena sencilla marcado en su extremo 5' (6-carboxyfluorescein, 60-nt), o con el correspondiente de doble cadena (60-pb), en solución de unión (Tris-HCl 40 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 5 mM). Las reacciones se cargaron y resolvieron en un gel de poliacrilamida nativo al 4 %, en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM, pH 7.5 y ácido etilendiaminotetraacético 0.5 mM). Los complejos ADN-proteína se visualizaron a 600 nm en un escáner Odyssey[®] FC Scanner Imaging System (LI-COR Biosciences). Para analizar la efectividad del inhibidor B02 (Cayman Chemical 1911) sobre la proteína Amex.RAD51, se incubaron concentraciones crecientes del fármaco disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) con la proteína previo al ensayo de unión. La detección de los complejos ADN-proteína se realizaron como se describió anteriormente. Las bandas se cuantificaron mediante densitometría empleando el programa Image Studio Lite Version 5.2 (LI-COR Biosciences).

7.5 Ensayos de actividad nucleasa

Con la finalidad de determinar la actividad nucleasa, una concentración fija de la proteína Amex.MRE11 purificada se incubó con una sonda de ADN de doble cadena no marcada (30 pb), en solución para nucleasa (Tris-HCl 30 mM, DTT 1 mM, KCl 50 mM, BSA 50 µg/mL, MnCl₂ 5 mM) por 30, 60, 90, 120 y 180 min. Después de la incubación, las reacciones se detuvieron con 0.1 mg/mL de proteinasa K y dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) al 3 %, posteriormente se resolvieron en un gel de agarosa al 1.5 % tenido con bromuro de etidio. Para analizar la polaridad de esta actividad, la proteína purificada se incubó con el oligonucleótido fluorescente de 60-nt, previamente mencionado, en solución para nucleasa por tiempos de 15, 30 y 60 min. El fármaco Mirina (Cayman Chemical 299953-00-7) se utilizó como inhibidor de la actividad nucleasa de Amex.MRE11 sobre el oligonucleótido fluorescente de doble cadena, previamente descrito. Para ello se agregaron concentraciones crecientes de Mirina (disuelto en DMSO) a las mezclas

de reacción. La detección, visualización y cuantificación de las bandas se realizaron como fue descrito anteriormente.

7.6 Cuantificación por PCR tiempo real (qPCR)

Para la extracción de ARN, se utilizaron tres organismos de 7.5 – 8.5 cm de longitud (cabeza-cola) para cada punto de tiempo: 0 hpa (horas post-amputación), 12 hpa, 24 hpa, 3 dpa, 5 dpa, 7 dpa, 10 dpa, 14 dpa, 21, dpa y 28 dpa. Los individuos fueron anestesiados por inmersión en benzocaína (0,01%, 4-aminobenzoato de etilo, Sigma-Aldrich 112909). Se amputó la extremidad anterior derecha a nivel del zeugopodio medio utilizando un bisturí. Los tejidos se procesaron para extraer el ARN utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen 15596026). El ARN total se empleó para producir ADNc según el protocolo del fabricante (kit SuperScript III RNA to cDNA, Invitrogen 12574026). Los niveles de ARNm específicos se cuantificaron mediante RT-qPCR utilizando Master Mix SYBR™ Green PCR (Thermo Fisher Scientific 4309155) en una reacción de 20 µl. Se realizaron tres réplicas biológicas con tres reacciones de RT-qPCR independientes para cada punto de datos. Los datos se normalizaron utilizando los niveles de expresión de la ornitina descarboxilasa ODC1 como se reportó anteriormente (Guelke et al., 2015).

7.7 Amputación de extremidades de ajolote y administración de fármacos

Las salamandras *A. mexicanum* se obtuvieron de la Unidad de Gestión Ambiental del Centro de Investigaciones Acuáticas de Cuemanco, Universidad Autónoma Metropolitana de la Ciudad de México, Campus Xochimilco. Para cada experimento se utilizaron tres organismos de 7.5 – 8.5 cm de longitud (cabeza-cola). Los animales fueron anestesiados y amputados, como se mencionó anteriormente. Los fármacos B02 o Mirina (disueltos en DMSO y solución salina normal) se administraron por vía intramuscular en el músculo de la cola en diferentes momentos tras la amputación (**figura 12**) a una concentración de 50 mg/kg, como se reportó anteriormente en modelos murinos (Huang & Mazin, 2014; Petroni et al., 2018). Se incluyeron controles de vehículos inyectados sólo con DMSO y solución salina normal. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones Técnicas para el

Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" la cual está basada en la guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, *The Guide* 2011, NRC USA, bajo el Número de Registro Federal # BOO.02.08.01.01.0095/2014, otorgado por el Servicio Nacional de Salud, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICASADER). El proyecto "Manejo y crianza de *Ambystoma spp* y procesamiento experimental de tejidos para análisis funcionales y expresión genética" fue aceptado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales (IACUC), en el CINVESTAV, con el número de protocolo de uso de animales ID: 0209-16.

7.8 Colección y fijación de tejido

Después de los tratamientos farmacológicos, se volvieron a amputar las extremidades en varias etapas de la regeneración, se hizo el corte de 1 mm proximal a donde se hizo la primera amputación. Los tejidos se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4 % durante 16 horas a 4° C. A continuación, los tejidos se lavaron 3 veces (10 minutos cada uno) con buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) 0.75x y se colocaron en soluciones crecientes de sacarosa, al 10 %, 20 % y 30 % en PBS 0.75x durante 24 horas a 4° C. Después de la incubación, los miembros de los tejidos se embebieron en Tissue-TK O.C.T. (Sakura Finetek 4583), se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80° C. El seccionamiento de los tejidos se realizó con un microtomo criostático (Leica CM1860), se montaron secciones de 10 µm de grosor en portaobjetos recubiertos de gelatina y se conservaron posteriormente a -80° C hasta su uso.

7.9 Ensayos de inmunolocalización fluorescente

Para la tinción de inmunofluorescencia indirecta, los tejidos se secaron al aire durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las secciones se permeabilizaron y se bloquearon en una solución de PBS 1x con 0.5 % de Tritón X-100, 5 % de suero normal de cabra y 1 % de BSA en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Rad51 (3C10) de ratón (Santa Cruz Biotechnology sc53428), anti-Mre11 (18) de ratón (Santa Cruz Biotechnology sc135992) y anti-γH2AX (Ser139) de conejo (Sigma-

Aldrich 07-164). Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario durante una noche a 4° C en cámara húmeda; posteriormente, los portaobjetos se lavaron 3 veces (10 minutos cada uno) con PBS 1x. A continuación, las secciones se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor™ 594 anti-ratón de burro (Thermo Fisher Scientific A21203) y Alexa Fluor 647 anti-conejo de burro (Thermo Fisher Scientific A31573). Todos los anticuerpos se diluyeron al 1/700 en solución de bloqueo; después de la incubación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1x. Adicionalmente, los tejidos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, por sus siglas en inglés) a 1 µg/mL en PBS 1x y se incubaron en cámara húmeda durante 20 min a temperatura ambiente. Por último, las secciones se montaron con el medio de montaje Vectashield® (Vector Laboratories H-1000) y se conservaron a 4° C protegidas de la luz.

7.10 Tinciones de hematoxilina y eosina (H y E)

La tinción se llevó a cabo siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Hematoxylin & Eosin Stain kit, Vector laboratories H-3502). Los tejidos se descongelaron a temperatura ambiente, posteriormente se agregó la solución de hematoxilina sobre el portaobjetos y se incubó por 5 min. Se enjuagó dos veces con agua destilada por 15 s y se removió el exceso de agua. Se aplicó la solución *Bluing* cubriendo por completo los tejidos y se incubó por 15 s. Se enjuagó dos veces con agua destilada por 15 s, después se sumergió el portaobjetos en etanol al 100 % por 10 s y se removió el exceso de este. Se agregó la solución de eosina Y sobre el portaobjetos y se incubó por 3 min. Enseguida el portaobjetos se sumergió en etanol al 100 % por 10 s. Finalmente, se deshidrataron los tejidos con tres sumersiones en etanol al 100 % de 3 min cada una. Los tejidos se montaron con el medio de montaje anhidro Entellan® (Millipore 107960).

7.11 Tinción de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β gal)

La actividad de la β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β gal, por sus siglas en inglés) se detectó en tejidos crioseccionados según las instrucciones del fabricante (Senescence β -Galactosidase Staining Kit, Cell Signaling Technology 9860). A los tejidos congelados se les añadió suficiente solución de tinción de β -

Galactosidasa para cubrirlos por completo sobre el portaobjetos (aproximadamente 500 μ L). Los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda durante una noche a 37° C, posteriormente se retiró la solución de tñido, se secaron al aire libre y se montaron con el medio de montaje anhidro Entellan® (Millipore 107960).

7.12 Microscopia y procesamiento de las imágenes

Las imágenes de las secciones teñidas con H y E y SA- β gal se obtuvieron con un microscopio estereoscópico VE-S5 (VELAB™). Todos los recuentos de células senescentes positivas se realizaron manualmente utilizando el software gratuito ImageJ (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012). Las imágenes de inmunolocalización fluorescente se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS SP8.

8. Resultados

8.1 Dominios conservados en Amex.RAD51 y Amex.MRE11

Las secuencias de nucleótidos de *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11* se adquirieron de las bases de datos publicadas por Caballero et al., (Caballero-Perez et al., 2018), Stewart et al., (Stewart et al., 2013) y del Gene and EST Database disponible en el Sal-Site (<https://ambystoma.uky.edu/>). Para examinar el grado de conservación global y la presencia de dominios funcionales, las secuencias de la predicción de proteínas se alinearon con sus homólogas de diversos organismos modelo estrechamente relacionados, a través de alineamientos múltiples de secuencias (MSA). Así mismo, la información sobre la estructura secundaria de Amex.RAD51 se analizó utilizando el modelo de proteína cristalizada de Rad51 humana (HsRad51, PDB 5h1b). Amex.RAD51 presenta una similitud del 94,9 % con su respectivo homólogo. La **figura 5a** muestra un MSA reducido de Amex.RAD51, donde se destacan los dominios funcionales más relevantes. Como se puede observar, Amex.RAD51 conserva perfectamente todos los aminoácidos asociados a las actividades bioquímicas descritas en otros organismos, como los implicados en la unión a ADN de secuencia inespecífica (hélice-pinza-hélice, HhH), la unión a ATP (dominios Walker A y Walker B, WA y WB) y oligomerización de unidades de

Rad51 (BRC). Para profundizar en la estructura de los dominios conservados, se realizó una predicción de la estructura tridimensional mediante I-TASSER (A. Roy et al., 2010), en la que se introdujo la secuencia completa del ajolote como *query* (Amex.*rad51* ID: I0121895, Amex.*Mre11* ID: I0200683). La **figura 5c** muestra los alineamientos tridimensionales entre Amex.RAD51 (C-score de -0.13) y su equivalente humano.

Con la finalidad de completar esta evaluación *in silico*, se aplicó un enfoque similar a la secuencia de la proteína Amex.MRE11; en este caso, se incluyó en el MSA la información de la estructura secundaria de la Mre11 humana (HsMre11, 3t1i PDB). La **figura 5b** muestra el MSA reducido correspondiente, en el que se destacan los aminoácidos y dominios que participan en las funciones de la proteína. Amex.MRE11 conserva los dominios implicados en la unión al ADN, homodimerización de Mre11 y los seis motivos característicos de la fosfodiesterasa IV, con una similitud global del 74,1 %, curiosamente la región carboxilo-terminal es la menos conservada en todo el alineamiento lo cual no es completamente inesperado ya que esta región no contiene aminoácidos específicos relacionados con alguna función, como se puede observar en el MSA. Al igual que en el análisis de Amex.RAD51, la **figura 5d** muestra el alineamiento tridimensional entre Amex.MRE11 (C-score de -3,37) y su homólogo humano; cabe destacar que, en esta superposición estructural, Amex. MRE11 parece ser más largo que su homólogo humano, a pesar de que en el MSA presentan prácticamente la misma longitud, esto se debe a que el modelo empleado por I-TASSER para predecir la estructura terciaria corresponde a la HsRad51 cristalizada incompleta, a la que le falta el extremo carboxilo-terminal debido a un pobre bajo de estructuración, asociado a la ausencia de dominios funcionales en esta zona, como se mencionó anteriormente.

En resumen, esta aproximación *in silico* apoya la presencia de homólogos de Rad51 y Mre11 en *Ambystoma mexicanum*, con un alto grado de conservación de su. En general, estos resultados sugieren fuertemente la conservación de las actividades

bioquímicas de estas proteínas; y por lo tanto, su participación en las vías de reparación del ADN.

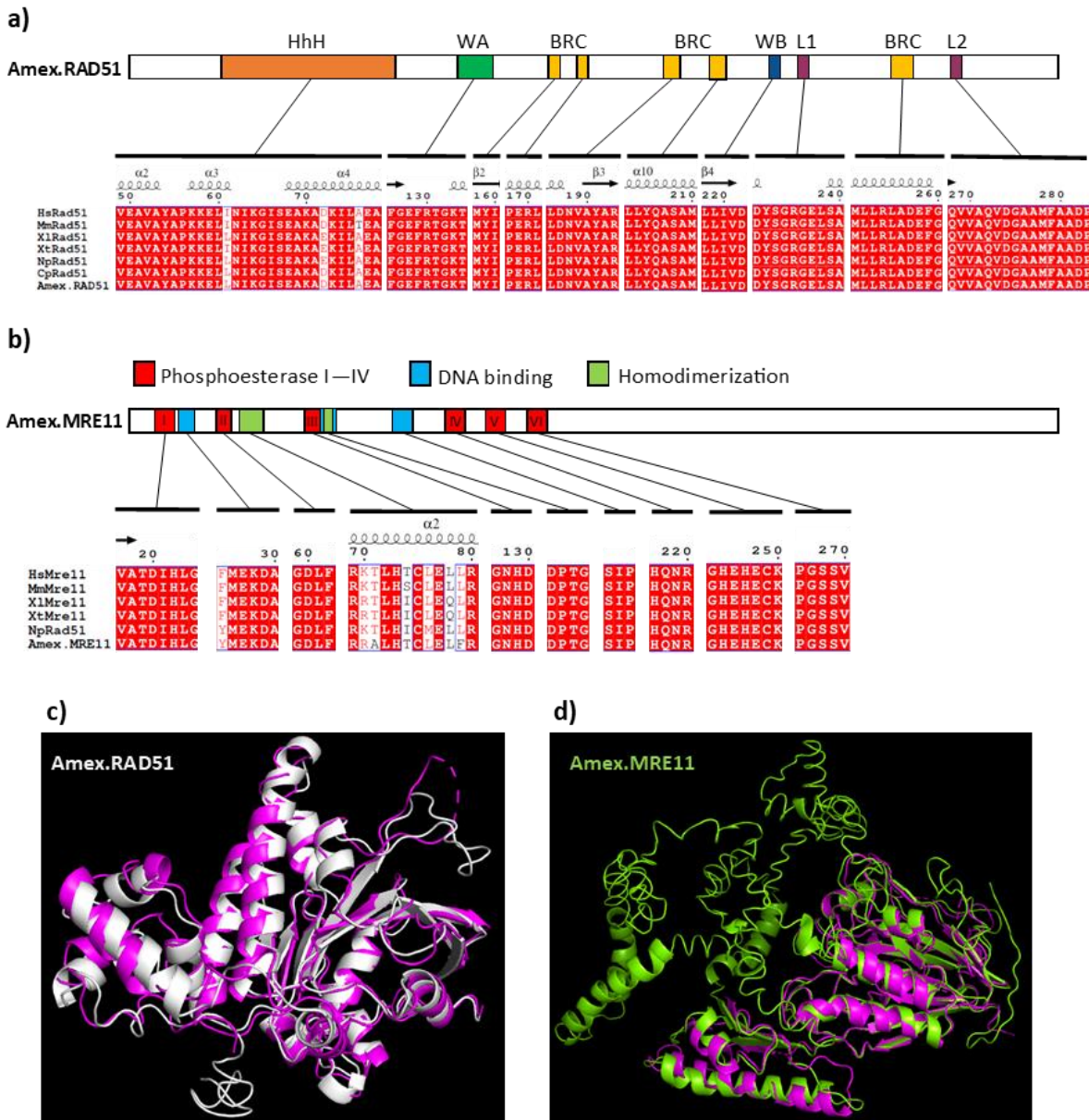


Figura 5. Análisis *in silico* de las secuencias proteicas de Amex.RAD51 y Amex.MRE11. a) MSA reducido de Amex.RAD51 con otros organismos modelo (*Hs*, *Homo sapiens*; *Mm*, *Mus musculus*; *Xl*, *Xenopus laevis*; *Xt*, *Xenopus tropicalis*; *Np*, *Nanorana parkeri*; *Cp*, *Cynops pyrrhogaster*), en el cual se señalan los principales dominios funcionales. b) MSA de Amex.MRE11 con sus homólogos de otros organismos. Las regiones asociadas con funciones se encuentran remarcadas. c) y d) muestran los alineamientos tridimensionales de las estructuras terciarias

preestablecidas para Amex.RAD51 y Amex.MRE11 con su respectivo homólogo humano (en rosa).

8.2 Clonación y expresión de las proteínas recombinantes

La caracterización de las funciones bioquímicas de Amex.RAD51 y Amex.MRE11 permitió confirmar las observaciones bioinformáticas obtenidas, así como diseñar e hipotetizar el resultado de los análisis *in vivo* que se llevaron a cabo posteriormente. Con la finalidad de continuar con este enfoque y con la intención de mejorar la caracterización proteica, así como corroborar la funcionalidad de algunos de los dominios predichos, se clonaron los genes *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11*, para expresar y purificar las proteínas recombinantes respectivas. En primer lugar, los genes *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11* se amplificaron a partir de ADNc sintetizado desde extractos de ARN de tejido de extremidad en regeneración. La **figura 6a** muestra los productos de amplificación de ambos genes obtenidos por PCR punto final; posteriormente, los genes se clonaron en el vector de expresión pET-100, para generar las construcciones pET100-*Amex.Rad51* y pET100-*Amex.Mre11* (**figura 6b y 6c**). La clonación en el vector pET-100 permitió el control de la expresión a través de un promotor inducible por IPTG; además, incluyó una etiqueta de polihistidina en el extremo amino-terminal de la proteína, lo que permitió monitorear la expresión de la proteína por inmunodetección en fase sólida (**figura 6d**) y la purificación por cromatografía de afinidad. Las proteínas recombinantes también son reconocidas específicamente por los anticuerpos anti-Rad51 y anti-Mre11 (**figura 6e**), los cuales fueron empleados posteriormente para los ensayos *in vivo*.

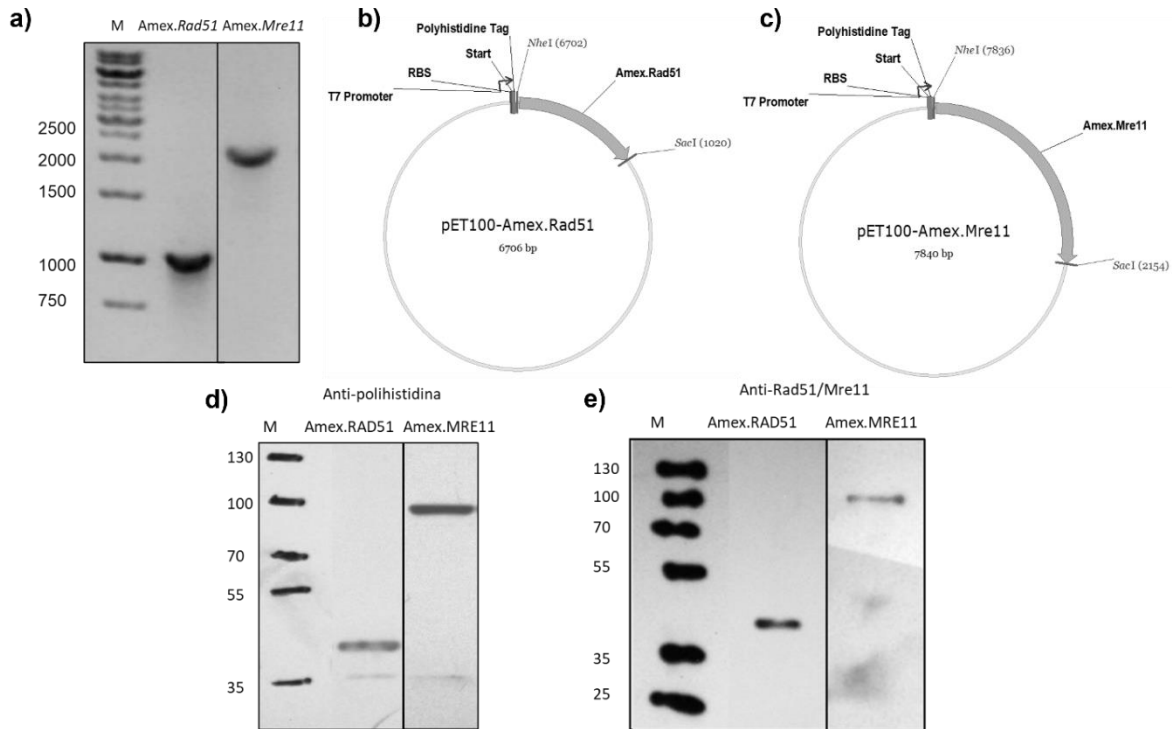


Figura 6. Clonación génica y expresión de proteínas recombinantes. a) gel de agarosa al 1 % con los amplicones (PCR punto final) de *Amex.Rad51* (1,026-pb) y *Amex.Mre11* (2,160-pb), amplificados a partir de ADNc de extremidad en regeneración. b) plásmido de expresión para *Amex.Rad51*, pET100-*Amex.Rad51*. c) plásmido de expresión para *Amex.Mre11*, pET100-*Amex.Mre11*. d) inmunodetección en fase sólida de *Amex.RAD51* (37 kDa) y *Amex.MRE11* (80 kDa), empleando el anticuerpo anti-polihistidina. e) inmunodetección en fase sólida de *Amex.RAD51* (37 kDa) y *Amex.MRE11* (80 kDa), empleando los anticuerpos anti-Rad51 y anti-Mre11.

8.3 Interacción de Amex.RAD51 con ADN

Una de las principales actividades bioquímicas realizadas por Rad51, es su unión al ADN no específica de secuencia, la cual es necesaria para ejecutar posteriormente otras funciones como ATPasa e intercambio de cadenas de ADN, que son esenciales para lograr la reparación mediada por homología (Mladenov et al., 2016). En este contexto, se comprobó la capacidad de unión al ADN de *Amex.RAD51* recombinante purificada, mediante un ensayo de desplazamiento de

movilidad electroforética (EMSA), en el que se incubaron concentraciones crecientes de la proteína con un oligonucleótido de doble cadena (60-pb) o un oligonucleótido de cadena sencilla (60-nt), ambos marcados en el extremo 5' con la etiqueta fluorescente 6-carboxifluoresceína. La interacción proteína-ADN se visualizó como un desplazamiento posicional de la banda fluorescente hacia la parte superior del gel de acrilamida, con respecto a la posición del oligonucleótido (sonda libre). Este ensayo reveló una correlación positiva significativa entre la concentración de Amex.RAD51 y la sonda desplazada, corroborando así la capacidad de esta proteína para unirse al ADN, como se muestra en las **figuras 7a y 7c**. Las bandas fluorescentes; que representan los complejos ADN-proteína, se cuantificaron mediante análisis densitométrico y se representaron gráficamente (**figuras 7b y 7d**).

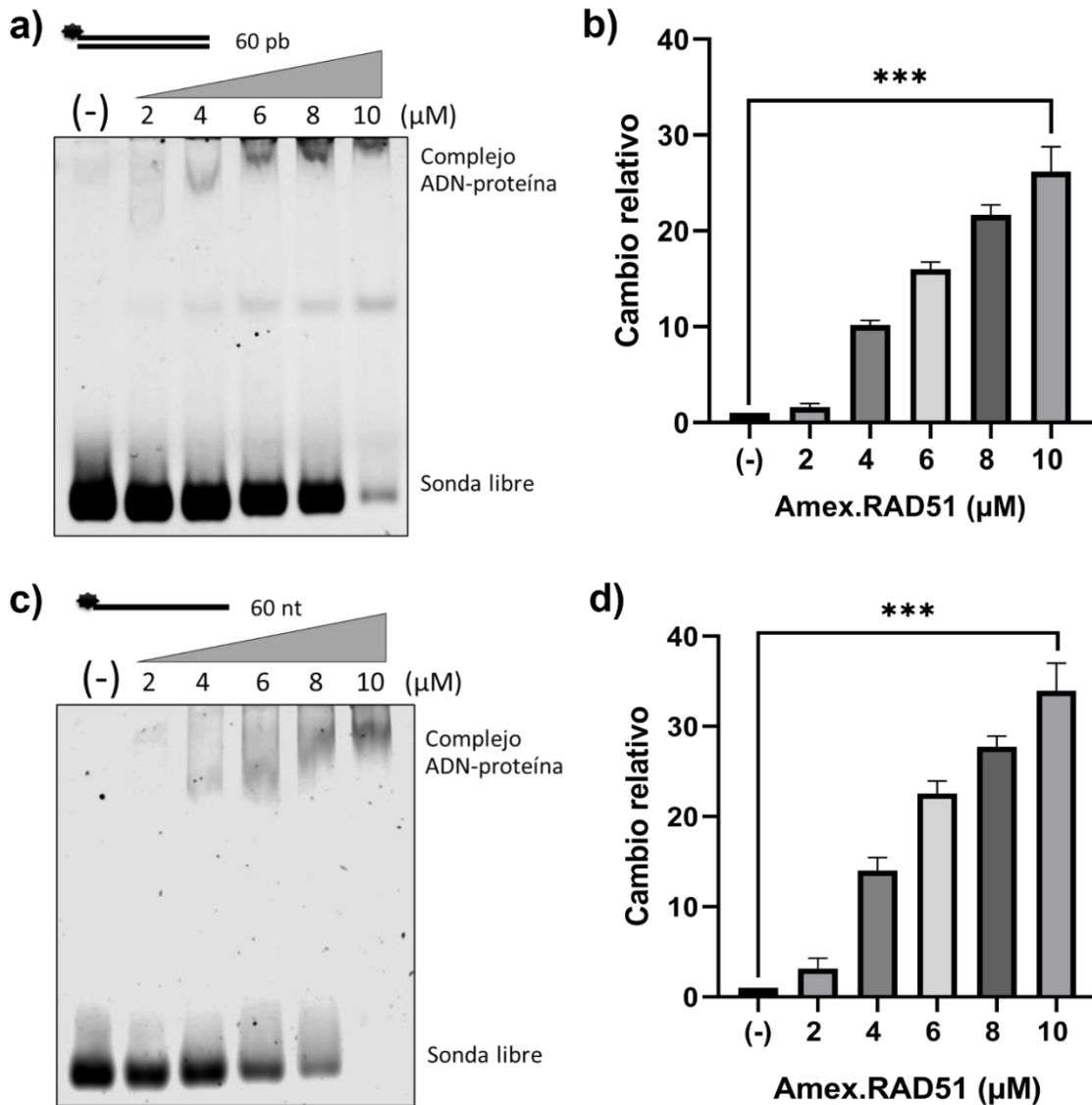


Figura 7. Actividades bioquímicas de Amex.RAD51. a) EMSA fluorescente con ADN bicatenario. c) EMSA fluorescente con ADN monocatenario. Se señalan los complejos ADN-proteína, así como la sonda libre. b) y d) gráficas de la cuantificación densitométrica de los complejos ADN-proteína de a) y c), normalizados con el control negativo (sin proteína). Las barras de error representan la desviación estándar. Análisis estadístico con prueba de ANOVA one-way. ***P<0.001 comparado con el control negativo.

8.4 Efecto de B02 en la interacción de Amex.RAD51 con ADN

B02 es un inhibidor químico específico para Rad51, desarrollado para mejorar la comprensión de las funciones celulares de Rad51 y aumentar la potencia de algunos fármacos contra el cáncer (Huang et al., 2011). B02 se ha utilizado con éxito en cultivos celulares *in vitro* así como en experimentos *in vivo*, utilizando ratones como modelo (Huang & Mazin, 2014; Huang et al., 2012). B02 interactúa físicamente con Rad51 e impide su unión al ADN, por lo que dificulta las funciones posteriores de Rad51; provocando así, la inhibición de la HR (Huang et al., 2012). Como parte de la caracterización bioquímica de Amex.RAD51 y para comprobar su idoneidad para estudios posteriores *in vivo* con el ajolote, se incluyeron concentraciones crecientes de B02 en el ensayo de EMSA descrito anteriormente, en el cual se utilizó una concentración fija de Amex.RAD51. **La figura 8a** ilustra cómo la interacción de Amex.RAD51 y la sonda fluorescente se inhibe a medida que aumenta la cantidad de B02, lo que se representa como una reducción del complejo desplazado y la recuperación de la banda correspondiente a la sonda libre, en el fondo del gel. En este caso, se cuantificaron las bandas no retardadas y se normalizaron con el control positivo (sin inhibidor), como puede verse en la **figura 8b**. En general, estos análisis bioquímicos confirman la conservación funcional de Amex.RAD51, además, la inhibición por B02 *in vitro* se consideró como una excelente señal que ayuda a predecir resultados satisfactorios en estudios en los que el inhibidor se aplique sistemáticamente a organismos completos.

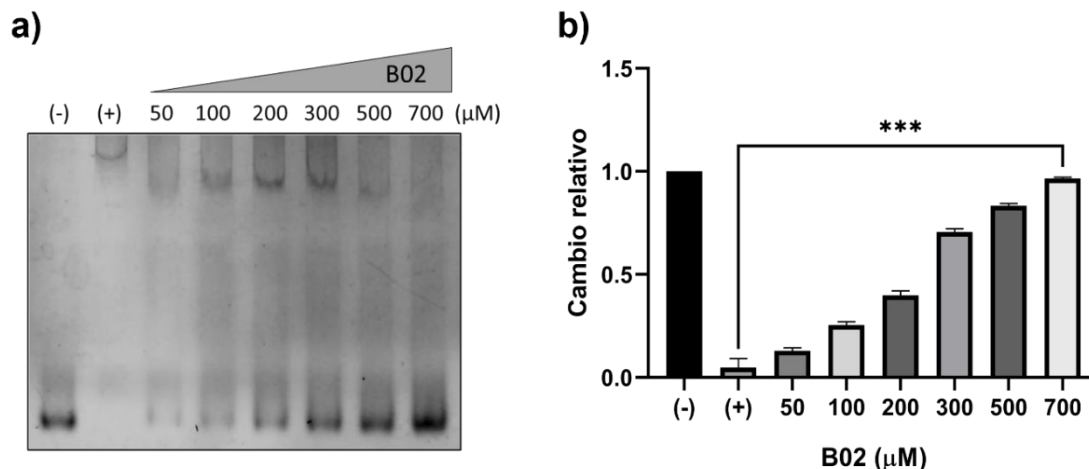


Figura 8. EMSA inhibitorio con el fármaco B02. a) EMSA de Amex.RAD51 donde se utilizaron concentraciones crecientes de B02 para inhibir la interacción ADN-proteína. b) cuantificación densitométrica de la sonda libre, normalizada con el control positivo (sin inhibidor). Las barras de error representan la desviación estándar. Análisis estadístico con prueba de ANOVA one-way. ***P<0.001 comparado con el control positivo.

8.5 Actividades bioquímicas de Amex.MRE11: interacción con ADN y actividad nucleolítica

Mre11 es una nucleasa de ADN incluida en el complejo MRN, que está constituido además por Rad50 y Nbs1 (Syed & Tainer, 2018). Al igual que Rad51, Mre11 necesita unirse al ADN para ejercer sus funciones catalíticas de nucleasa (Paull, 2018); en este contexto, se utilizó la sonda marcada para comprobar si esta proteína posee una actividad de unión al ADN de forma inespecífica a la secuencia. **La Figura 9a** muestra el desplazamiento electroforético realizado por la interacción ADN-proteína en el que se incubaron concentraciones crecientes de Amex.MRE11 con la sonda fluorescente monocatenaria, utilizada anteriormente. Las bandas correspondientes al complejo sonda-Amex.MRE11 se cuantificaron por densitometría y se graficaron los datos (**figura 9b**).

En la vía de recombinación homóloga, el primer paso tras la identificación de un DSB consiste en la resección de ambos extremos del ADN para generar salientes

3' con la intención de desencadenar la cascada de señalización que culminará en la reparación del daño (Paull, 2018). En este contexto, Mre11 es una de las nucleasas implicadas en la resección del ADN, donde utiliza sus dos diferentes funciones de nucleasa, la endonucleasa, implicada en el inicio y selección de la vía de reparación de DSB, y la actividad exonucleasa 3'-5', utilizada para ayudar a producir ADN de cadena sencilla (Stracker & Petrini, 2011). A continuación, probamos la capacidad exonucleasa de Amex.MRE11 mediante un ensayo de degradación del ADN. Para ello se incubó una sonda de doble cadena no etiquetada (30-pb) durante diferentes tiempos con una concentración fija de Amex.MRE11, después de la incubación la proteína se desnaturalizó con SDS y proteinasa K para posteriormente analizarla mediante electroforesis. La **figura 9c** muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, donde se puede observar que la intensidad de la banda de ADN disminuye a medida que transcurre el tiempo de incubación, como resultado de su degradación mediada por Amex.MRE11. Mre11 utiliza el cofactor metálico Mn^{2+} para llevar a cabo la función de exonucleasa (Paull & Gellert, 1998); por lo tanto, se incluyó un control negativo en el que se sustituyó el Mn^{2+} por Mg^{2+} , de forma interesante, Amex.MRE11 fue capaz de emplear este segundo catión divalente para degradar la sonda, pero en menor grado que con Mn^{2+} (**figura 9c, carril 2**). Los resultados del análisis densitométrico se presentan en la **figura 9d**. Para evaluar la polaridad de la función exonucleasa, se estableció un ensayo de nucleasa con el oligonucleótido marcado en el extremo 5', mencionado anteriormente. En este se incubó una concentración fija de proteína Amex.MRE11 con la sonda fluorescente durante tiempos crecientes. En la **figura 9e** se puede apreciar el patrón de degradación esperado para una actividad exonucleasa con dirección 3' - 5', que se caracteriza por la aparición de fragmentos más pequeños a medida que avanza la incubación. Estos productos de degradación conservan la señal del fluoróforo, que se fija en el extremo 5', confirmando así que la acción nucleolítica realizada por Amex.MRE11 avanza desde el extremo 3' al 5'.

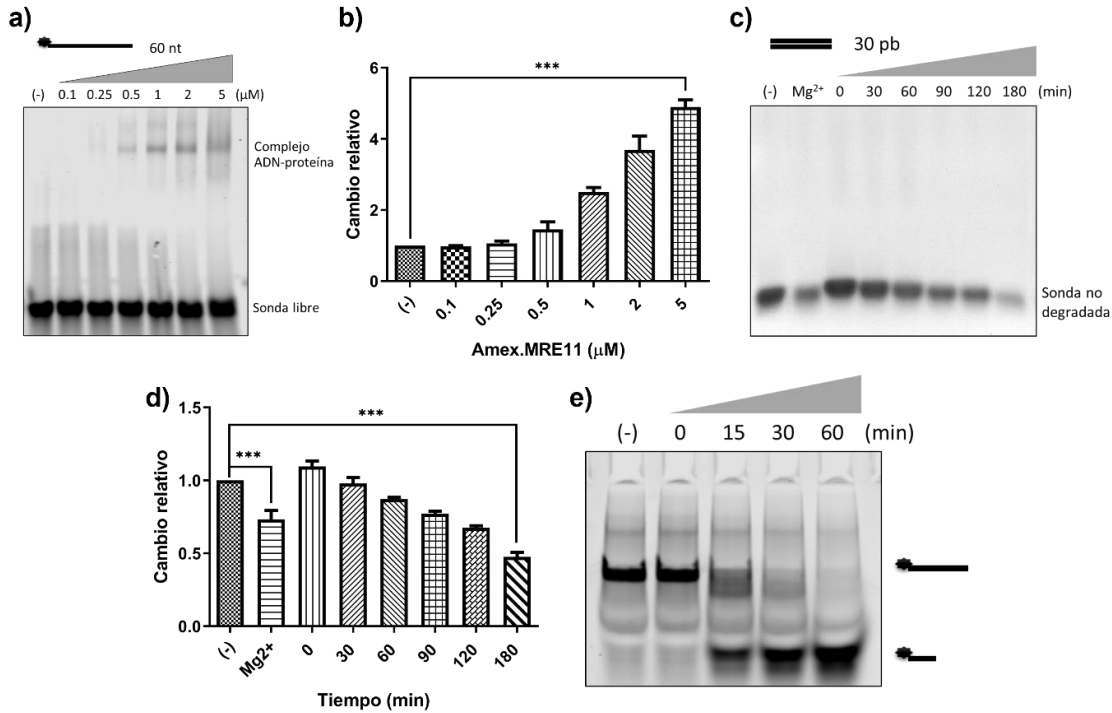


Figura 9. Actividades bioquímicas de Amex.MRE11. a) EMSA fluorescente, se muestran los complejos ADN-proteína, así como la sonda libre. b) gráfico del análisis densitométrico, los resultados se normalizaron con el control negativo (sin proteína). c) cinética de la actividad exonucleasa de Amex.MRE11 con ADN bicatenario no marcado (30-pb), señalado como “sonda no degradada”. El catión Mg²⁺ se utilizó como control. d) gráfico del análisis densitométrico, normalizado con el control negativo (sin proteína) de c). e) cinética de la actividad exonucleasa 3' - 5' de Amex.MRE11 con sonda fluorescente marcada en el extremo 5'. Las barras de error representan la desviación estándar. Análisis estadístico con prueba de ANOVA one-way. ***P<0.001 comparado contra los controles señalados con líneas negras.

8.6 Efecto de Mirina en la actividad nucleasa de Amex.MRE11

El inhibidor químico Mirina se obtuvo como resultado del desarrollo de nuevas moléculas que puedan ser utilizadas en el tratamiento del cáncer (Dupre et al., 2008). En concreto, Mirina es capaz de impedir la actividad exonucleasa de Mre11, una acción que además bloquea la activación del ATM dependiente de MRN sin

afectar su papel como quinasa; y como resultado, Mirina suprime la reparación mediada por homología (Dupre et al., 2008). Este inhibidor se ha utilizado exitosamente en estudios *in vivo*, donde el crecimiento tumoral en xenoinjertos de ratones se redujo eficazmente (Petroni et al., 2018). En concordancia con el ensayo de exonucleasa realizado anteriormente, la Amex.MRE11 purificada se incubó con concentraciones crecientes de Mirina previo a la adición a la reacción de la sonda fluorescente de doble cadena. Como puede observarse en la **figura 10a**, Mirina impide la degradación de la sonda, efecto que se evidencia por la recuperación de la banda superior (sonda no degradada) a medida que aumenta la concentración del inhibidor; estas bandas fueron cuantificadas por densitometría y graficadas (**figura 10b**). Estos resultados confirman la conservación funcional del Amex.MRE11 y, además, los ensayos de inhibición con Mirina demuestran que es un excelente candidato para estudiar la reparación del ADN en los estudios de regeneración *in vivo* en *A. mexicanum*.

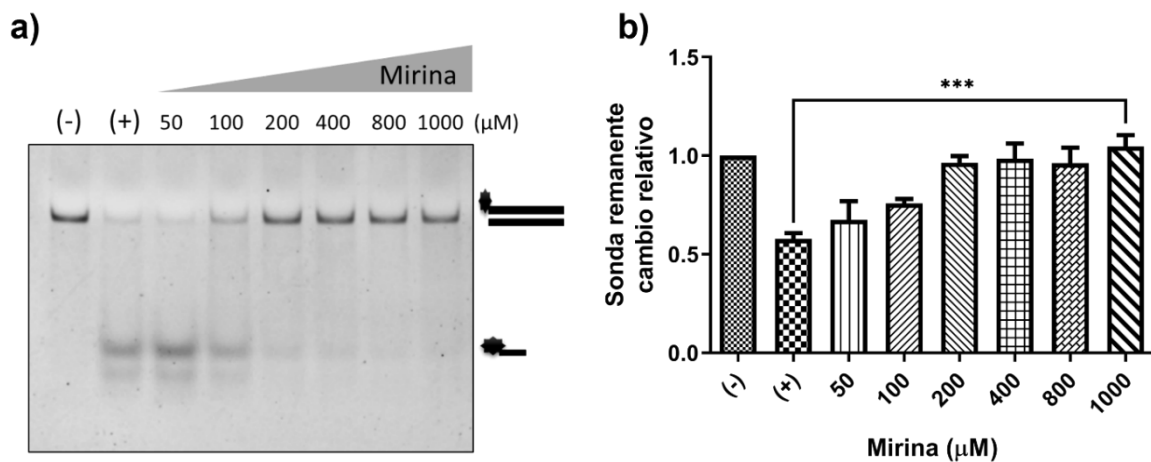


Figura 10. Inhibición de Amex.MRE11 con Mirina. a) Inhibición de la actividad exonucleasa de Amex.MRE11 con concentraciones crecientes de Mirina. b) gráfico del análisis densitométrico de la sonda no degradada de d). Las barras de error representan la desviación estándar. Análisis estadístico con prueba de ANOVA one-way. *** $P < 0.001$ comparado contra los controles señalados con líneas negras.

8.7 Análisis de los niveles de transcritos de *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11* durante la regeneración

Para realizar el diseño de los experimentos *in vivo*, se exploró el nivel transcripcional de *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11* a lo largo de la regeneración de las extremidades. Se aisló el ARN de tejido en regeneración en 10 puntos diferentes de tiempo post-amputación, con tres réplicas biológicas cada uno. Se sintetizó el ADNc, como se describe en la sección de metodología, y posteriormente, se realizaron análisis de qPCR para cada punto de tiempo con tres réplicas técnicas. Las **figuras 11a y 11b** muestran los resultados de la qPCR para *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11*, respectivamente. Como se puede observar, los niveles de transcrito de *Amex.Rad51* aumentan significativamente a los 10 dpa y disminuyen a medida que avanza la regeneración (**figura 11a**). Este aumento se produce en la fase de blastema medio, con base en el tamaño de los organismos utilizados (Voss et al., 2015). En el caso del gen *Amex.Mre11*, se observó un patrón similar, pero con un notable aumento en los niveles de transcripción a los 7 dpa y disminuyen a medida que avanza la regeneración (**figura 11b**). En este caso, el pico de expresión coincide con un estadio de blastema temprano, con base en el tamaño de los organismos empleados (Voss et al., 2015). Los datos obtenidos con estos análisis se emplearon para diseñar los experimentos *in vivo*, con la finalidad de definir cuándo debía tener lugar la administración de cada uno de los inhibidores. Cabe mencionar que, en adición al resultado anterior, se realizó un análisis de la expresión de los dos genes utilizando información procedente de bases de datos de ARN-seq previamente publicadas (Caballero-Perez et al., 2018; Stewart et al., 2013). Estos análisis coinciden con los niveles cuantificados mediante qPCR, ya que muestran un incremento en la expresión durante la etapa de blastema medio, siendo mayor para *Amex.Rad51* en los días 10 a 14 post-amputación y para *Amex.Mre11* en los días 5 a 14 post-amputación (**figura 11c y d**). La **figura 11e** representa la organización del experimento, la administración del inhibidor se aplicó durante 6 días consecutivos, abarcando dos y tres días antes y después del pico de expresión génica, por lo tanto, B02 se administró de 7 a 12 dpa, y Mirina de 6 a 11 dpa. Se establecieron dos caminos diferentes después de la administración. En uno

de ellos, se dejó que los organismos regeneraran hasta los 28 dpa, momento en el que se volvieron a amputar (**grupos 1 y 2, figura 11e**). El objetivo de este experimento fue observar si los inhibidores tenían algún efecto durante la regeneración de las estructuras de las patas como resultado de la acumulación de daño en el ADN. En el segundo diseño experimental, los ajolotes fueron re-amputados inmediatamente después de la última administración, es decir a los 12 dpa para B02 y 11 dpa para Mirina (**grupos 3 y 4, figura 11e**), con el objetivo de analizar a nivel molecular si los inhibidores producían acumulación de daño en el ADN y/o cambios en la localización sub-celular de Amex.RAD51 y Amex.MRE11.

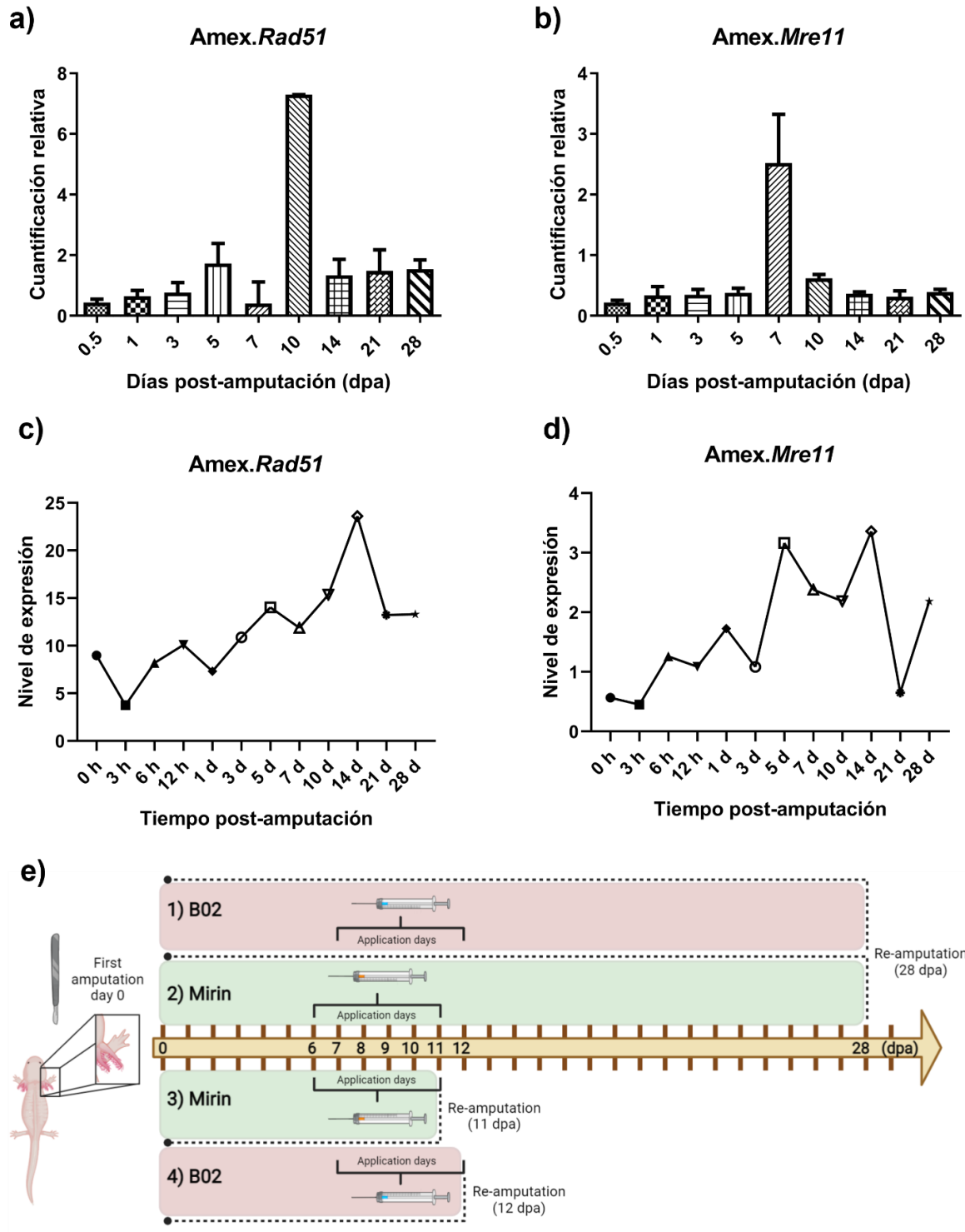


Figura 11. Análisis de expresión y organización de experimentos *in vivo*. a) y b) muestran el análisis de expresión para *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11*, mediante qPCR a diferentes puntos de tiempo a lo largo de los primeros 28 días de la regeneración.

c) y d) muestran el análisis de expresión para *Amex.Rad51* y *Amex.Mre11*, utilizando información procedente de bases de datos de ARN-seq a lo largo de los primeros 28 días de la regeneración (Caballero-Perez et al., 2018; Stewart et al., 2013). e) el esquema muestra los cuatro grupos de animales utilizados en esta investigación. Las líneas verticales en la flecha indican los días post-amputación (dpa). Se muestran los tiempos de amputación (día 0), los días de aplicación de fármacos (7 a 12 para B02 y 6 a 11 para Mirina) y re-amputación.

8.8 Efecto de los inhibidores B02 y Mirina a los 28 dpa

Para la segunda sección de este proyecto se realizaron experimento *in vivo*, utilizando el modelo *Ambystoma mexicanum*. Los organismos se seleccionaron por talla (7.5 a 8.5 cm) y se pesaron para calcular la cantidad de fármaco a administrar. Posteriormente, los animales fueron anestesiados por inmersión en benzocaína (0.2 %) para poder ser amputados. Este procedimiento se realizó utilizando un bisturí y haciendo el corte en la extremidad anterior derecha, a la mitad del zeugopodio. La administración de los fármacos se realizó mediante una inyección en la parte inferior del músculo de la cola, en los días indicados en el esquema de la **figura 11e**. Después de los días de regeneración indicados en la **figura 11e**, las extremidades fueron re-amputadas. Enseguida, las extremidades se fijaron para poder realizar los cortes histológicos en un criostato. Estos pasos se esquematizan en la **figura 12**.



Figura 12. Metodología empleada para los experimentos *in vivo*. El esquema en la izquierda describe los pasos realizados. En la derecha se muestran las imágenes correspondientes a cada paso.

Como se mencionó anteriormente en la estrategia de administración, los grupos 1 y 2 se dejaron regenerar hasta el día 28 post-amputación, con la intención de analizar si los inhibidores son capaces de producir efectos a nivel macroscópico. En este sentido, se hizo un seguimiento de la regeneración a través de fotografías. Las imágenes se obtuvieron en distintos tiempos post-amputación empleando un microscopio estereoscópico de campo claro. La **figura 13** muestra imágenes representativas de los controles y tratamientos durante este proceso. En adición, se hizo una cuantificación del área regenerada, tomando como referencia el plano de amputación. Con este análisis se puede observar que el inhibidor B02 provoca un ligero retraso en comparación con los controles, el cual no es estadísticamente significativo, sin embargo, puede observarse la tendencia que produce. Por otra parte, Mirina no provocó un efecto observable con este enfoque.

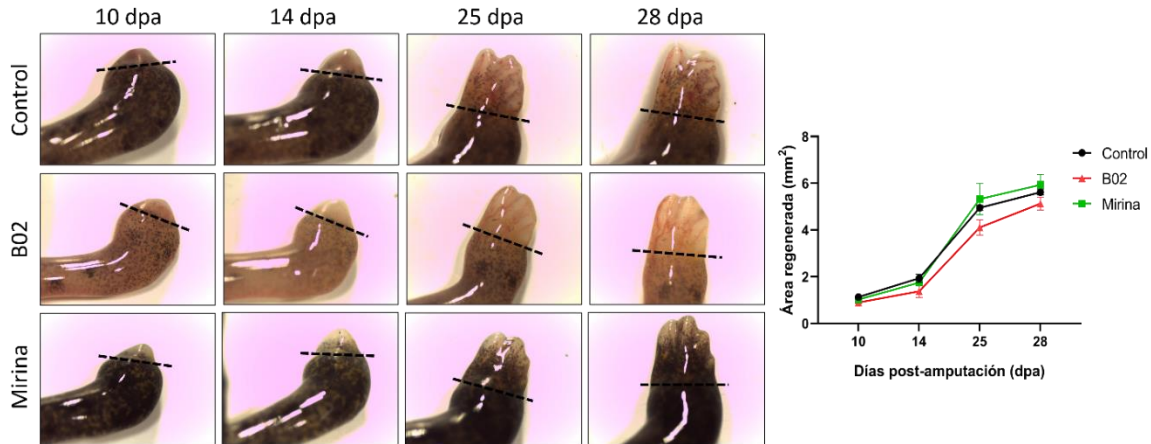


Figura 13. Monitoreo de la regeneración. Izquierda, seguimiento de la regeneración a distintos tiempos post-amputación. Se muestran imágenes representativas de los organismos controles y tratados. Las líneas punteadas indican el sitio de amputación. Derecha, cuantificación del área regenerada. Se utilizaron tres replicados biológicos para cada tratamiento.

La primera columna de La **figura 14** muestra los resultados representativos de las extremidades regeneradas a los 28 dpa. Adicionalmente, para profundizar en el resultado previamente descrito (**figura 13**), se realizaron tinciones de H y E en estos mismos tejidos, y como se puede observar hay un evidente problema en la formación del dedo 1 en la extremidad tratada con B02. Por otro lado, las extremidades del control presentan los cuatro dígitos, que aún no están completamente regenerados en esta etapa (28 dpa), como se esperaba. Curiosamente, la inhibición de Amex.MRE11 por Mirina no mostró ninguna afectación observable con los sistemas de detección empleados.

Aunque se ha pensado que la regeneración en la salamandra es un proceso altamente eficiente; donde los tejidos se restablecen de forma fiable, varios estudios han observado la aparición de malformaciones en un alto porcentaje de los animales analizados (Bothe, Mahlow, & Frobisch, 2021; Diogo, Nacu, & Tanaka, 2014; Thompson, Muzinic, Muzinic, Niemiller, & Voss, 2014). En línea con este argumento, no se puede descartar en este estudio la aparición de malformaciones de manera

natural tras la amputación; por lo tanto, con la intención de buscar una asociación de la acumulación de daño en el ADN con los efectos observados en la regeneración, se llevó a cabo la determinación de células senescentes. La senescencia es un mecanismo natural en el que las células detienen su proliferación y desarrollan un fenotipo secretor específico que altera las células circundantes produciendo diferentes resultados (revisado en (M. H. Yun, 2018)). Se ha descrito que algunas células entran en un proceso de senescencia en tejidos altamente proliferativos como en la embriogénesis y la regeneración, donde juegan un papel fundamental para lograr la correcta formación de los tejidos (Davaapil, Brockes, & Yun, 2017; Villiard et al., 2017; Maximina H. Yun et al., 2015). Además, la senescencia celular también puede producirse como respuesta a daño acumulado e irreparable en el ADN (d'Adda di Fagagna, 2008; Hernandez-Segura, Nehme, & Demaria, 2018; Hills & Diffley, 2014). La tercera columna de la **figura 14** muestra los resultados obtenidos con la tinción de senescencia, y como puede observarse, las extremidades tratadas con B02 presentan un mayor número de células positivas a senescencia en comparación con la extremidad no tratada; también las extremidades tratadas con Mirina muestran un mayor número de células senescentes en comparación con el control, pero inferior al observado en la extremidad tratada con B02. Las células senescentes positivas fueron cuantificadas y graficadas (**figura 14, gráfico de la derecha**). Los hallazgos anteriores sugieren que el aumento de células senescentes observado a los 28 dpa; cuando se administró el inhibidor B02, podría ser una consecuencia de la inhibición de la función de Amex.RAD51. En consecuencia, la afectación de todo el mecanismo de HR, lo que implica que las rupturas en el ADN que surgen durante la alta proliferación en el blastema no están siendo reparadas. En este caso, el aumento de las células senescentes no formaría parte del proceso natural de la regeneración; por lo tanto, se presentaron dificultades que resultaron en la afectación de la regeneración o en un retraso, como se observa en la **figura 13**.

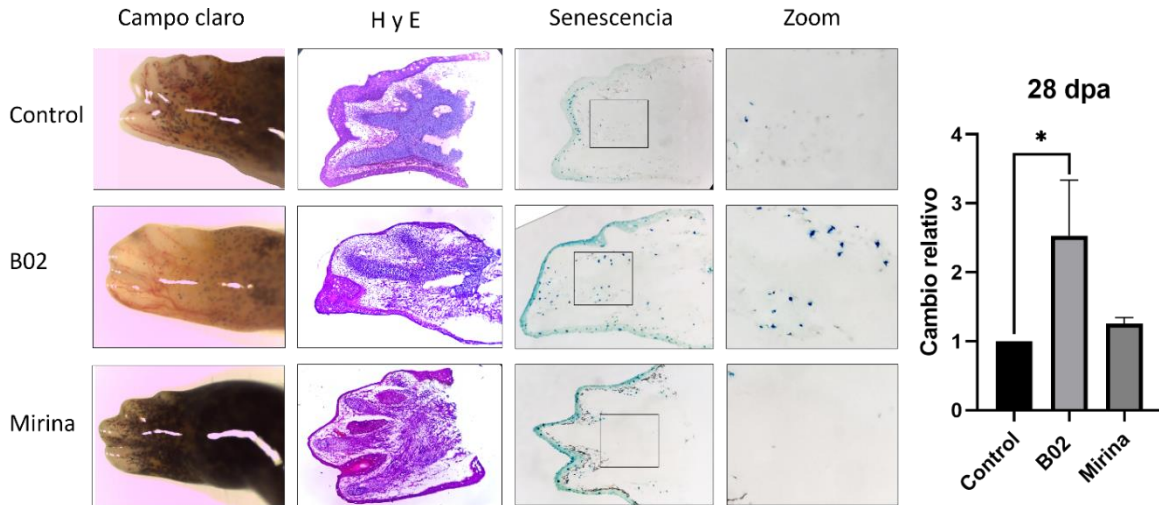


Figura 14. Regeneración de extremidades a los 28 dpa. La primera columna muestra las imágenes de campo claro de la extremidad regenerada. La segunda columna muestra las tinciones de H y E, donde se aprecian estructuras internas del autopodio, como los dedos. La tercera y cuarta columnas representan la tinción de senescencia; las células positivas están teñidas en azul. La gráfica de la derecha muestra la cuantificación de células senescentes, normalizadas con el número de estas células en el control no tratado (tres replicados biológicos para cada tratamiento). Las barras de error representan la desviación estándar. Análisis estadístico con prueba de ANOVA one-way. *** $P < 0.05$ comparado contra el control no tratado.

8.9 Efecto de los inhibidores B02 y Mirina durante la etapa de blastema medio

A los grupos 3 y 4 se les administró los fármacos Mirina y B02 (en los días señalados en la **figura 11e**), posteriormente se volvieron a amputar a los 11 y 12 dpa, respectivamente (**figura 11e**). Los tejidos obtenidos se analizaron mediante tinción de inmunofluorescencia para determinar la localización sub-celular de Amex.RAD51, Amex.MRE11 y, además, para ver el efecto sobre el daño al ADN, se detectó la señal de γ H2AX, un marcador específico de DSBs en el ADN. Es imprescindible resaltar que a estos miembros amputados no se les permitió regenerarse hasta los 28 dpa, ya que se especuló que la mayor parte del daño en

el ADN producido de forma natural más el provocado por la aplicación de los inhibidores, ya habría sido reparado en esta fase de rediferenciación. Esta idea está respaldada por varios estudios que demuestran que los mecanismos de reparación del ADN en general actúan en cuestión de minutos (Hittelman & Pollard, 1982; Jazayeri et al., 2006; Y. Liu et al., 2020). Por lo tanto, la determinación del daño en el ADN en sí debe realizarse cuando los inhibidores químicos todavía están ejerciendo sus efectos. En línea con esta perspectiva, la **figura 15a** muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal para Amex.RAD51 y γ H2AX cuando se aplicó el inhibidor B02 (grupo 4); como puede observarse, hay un gran incremento en el número de células de blastema que presentan la señal para γ H2AX, lo que indica un aumento de DSBs durante esta etapa en la regeneración de la extremidad. En cuanto a Amex.RAD51, prácticamente todos los núcleos de las células del blastema presentan la señal para esta proteína. Curiosamente, en las células de la epidermis, Amex.RAD51 se encuentra en tanto en los núcleos como en el citoplasma (**figura 15a, zoom**). Con la metodología empleada, no se observó ninguna diferencia en la expresión de Amex.RAD51 entre los organismos tratados y no tratados, lo que demuestra que el inhibidor no afecta los niveles de la proteína Amex.RAD51. Se observó una tendencia paralela para la marca γ H2AX cuando se utilizó el inhibidor Mirina, presentando un aumento en el número de células γ H2AX positivas dentro del blastema (**figura 15c**). De forma similar a las extremidades tratadas con B02, la mayoría de las células del blastema presentan la señal Amex.MRE11 en los núcleos, y en la epidermis la proteína se encuentra en ambos, núcleo y citoplasma (**figura 15b, zoom**). Cabe destacar que no se observaron cambios en la localización o expresión de la proteína con esta técnica cuando se compararon los miembros control con los tratados. En las figuras **15b y 15d** se muestra la cuantificación de las células γ H2AX positivas. Curiosamente, en algunos casos la señal de γ H2AX se observó no sólo dentro del núcleo, sino en la región peri-nuclear o incluso en el citoplasma, como puede observarse en las figuras **15a y 15b del zoom**, siendo esta observación especialmente evidente en el tejido epidérmico. La localización γ H2AX ectópica es un fenómeno poco frecuente que se

ha observado previamente en casos muy concretos (Jung, Kim, & Kim, 2008; Jung & Kim, 2011).

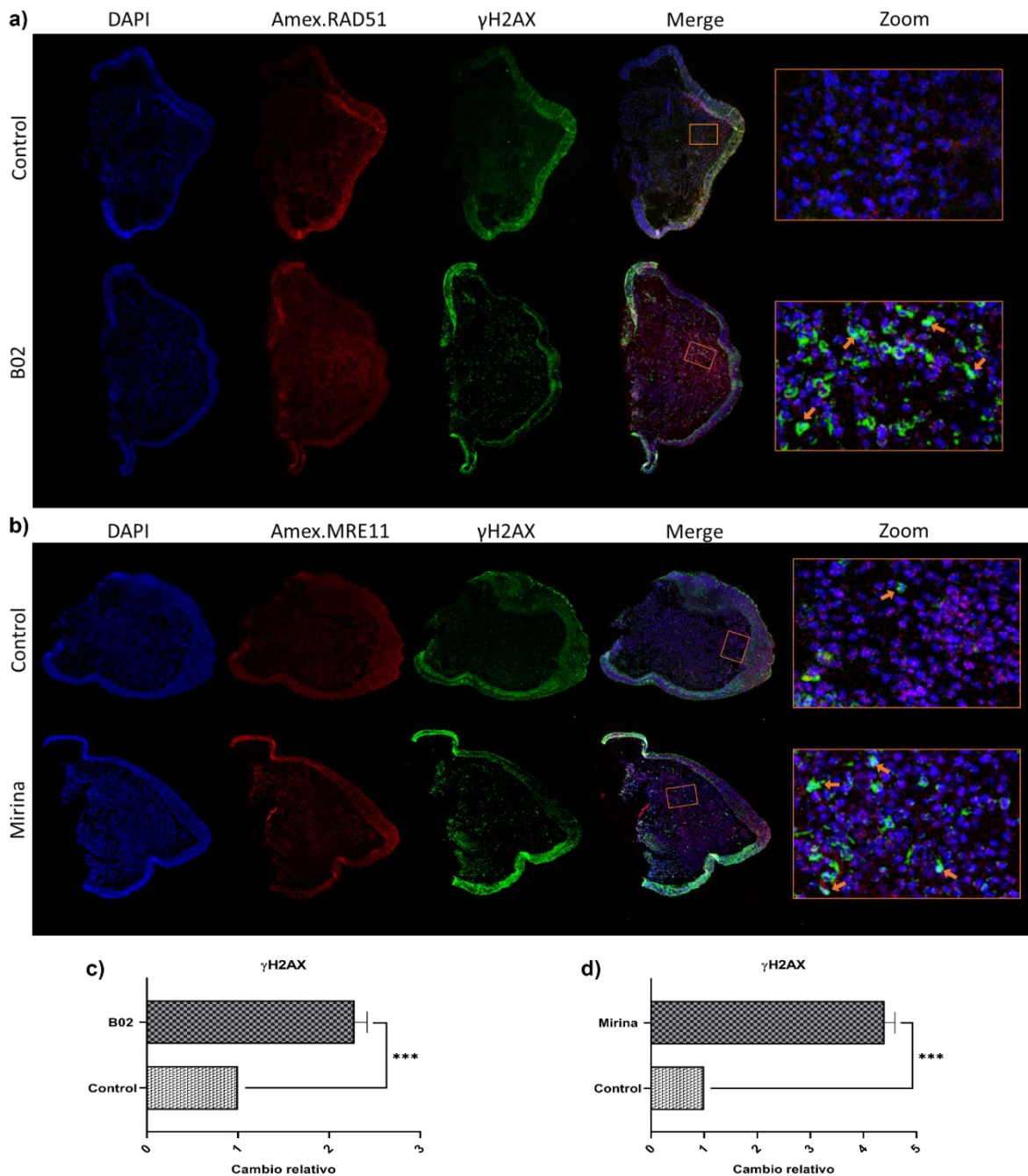


Figura 15. Inmunolocalización de Amex.RAD51, Amex.MRE11 y γ H2AX. a) inmunolocalización de Amex.RAD51 y γ H2AX en extremidades tratadas con B02 y re-amputadas en la etapa de blastema medio (12 dpa). b) inmunolocalización de

Amex.MRE11 y γ H2AX en extremidades tratadas con Mirina y re-amputadas en la etapa de blastema medio (11 dpa). Los cuadrados naranjas de las imágenes sobrepuestas (cuarta columna) se amplían y se muestran en los paneles de la derecha. Las flechas naranjas indican localización nuclear de γ H2AX. Los gráficos en c) y d) representan la cuantificación de las células positivas para γ H2AX en el blastema, y su comparación con el control correspondiente (tres replicados biológicos para cada tratamiento). Las barras de error representan la desviación estándar. Análisis estadístico con la prueba T. * $P < 0.05$ comparado contra el control no tratado

9. Discusión

La regeneración de tejidos en el ajolote es un mecanismo fascinante, en el que decenas de vías moleculares y celulares participan para restablecer los tejidos perdidos, así como sus funciones. Naturalmente, durante la regeneración, la salamandra debe asegurar la estabilidad del genoma para garantizar que las nuevas células y tejidos funcionen correctamente. En este contexto, planteamos la hipótesis de que el ajolote debe contar con mecanismos de reparación del ADN finamente regulados para hacer frente a todos los obstáculos que implica la regeneración, incluida la replicación de un genoma enorme y complejo (Nowoshilow et al., 2018). Estas características hacen que el genoma del ajolote sea propenso a sufrir daños en el ADN durante la regeneración (revisado en (Garcia-Lepe et al., 2021), sobre todo por la aceleración del ciclo celular que este proceso conlleva (Rodrigo Albors et al., 2015; Rost & Rodrigo Albors, 2016). En línea con estos argumentos, caracterizamos dos elementos de la vía de reparación por recombinación homóloga, uno de los mecanismos más relevantes involucrados en la resolución del daño al ADN asociado a la replicación.

Como se pudo observar en nuestro alineamiento de proteínas en la **figura 5**, el homólogo Amex.RAD51 presenta un alto grado de conservación cuando se compara con aquellos de mamíferos y algunas otras especies de anfibios. La observación anterior se correlaciona con el establecimiento de Rad51 y la

recombinación homóloga como un procedimiento bastante conservado desde bacterias hasta los organismos más complejos (Mladenov et al., 2016). Amex.RAD51 posee una identidad global del 94.9 % en comparación con su homólogo humano, datos que sugieren fuertemente la conservación de la estructura y, por tanto, la similitud funcional. De hecho, Amex.RAD51 presenta todos los motivos y dominios (**figura 5a**) asociados a sus funciones específicas, como la unión al ADN, el intercambio de cadenas, la homodimerización y actividad ATPasa (Benson et al., 1994; Gupta et al., 1997; Namsaraev & Berg, 1997). En relación con lo anterior, Amex.RAD51 conserva dos regiones importantes que se han asociado con la unión al ADN, los bucles flexibles L1 y L2, que están presentes en la Rad51 de eucariontes y también en su homólogo bacteriano RecA (Renodon-Corniere et al., 2008; Reymer, Frykholm, Morimatsu, Takahashi, & Norden, 2009; Story, Weber, & Steitz, 1992). Además, Amex.RAD51 conserva la Tyr232, un aminoácido contenido en el bucle L1 que ha demostrado ser esencial en la actividad de unión al ADN, y el Asp231 implicado en la actividad de intercambio de cadenas (Matsuo, Sakane, Takizawa, Takahashi, & Kurumizaka, 2006). En nuestro análisis a través de las bases de datos disponibles, sólo pudimos identificar un gen para la proteína Amex.Rad51 en el genoma del ajolote, una observación que contrasta con las realizadas por Maeshima et al., quienes encontraron dos homólogos no alélicos de Rad51 (XRad51.1 y XRad51.2) en el genoma del anfibio *Xenopus laevis*, curiosamente ambos genes presentaban un alto grado de conservación pero con marcadas diferencias en su patrón de expresión (Maeshima, Morimatsu, & Horii, 1996). Por último, mediante el alineamiento de la estructura tridimensional predicha para Rad51 con su homóloga humana (Xu et al., 2017), pudimos verificar el alto grado de conservación sugerido por el MSA. Para Amex.MRE11, el análisis *in silico* también demostró un alto nivel de conservación, con un 74.1 % de identidad al compararla con la proteína humana. La conservación de los motivos implicados en las actividades reportadas es consistente con investigaciones previas llevadas a cabo en otros organismos, incluyendo los seis elementos fosfodiesterasa (**figura 5b**) (Garcia, Phelps, Gray, & Neale, 2011; Paull & Gellert, 1998). A pesar de que Amex.MRE11 muestra una longitud bastante similar a la de los otros organismos

incluidos en el MSA, en el alineamiento estructural tridimensional Amex.MRE11 aparenta ser más larga en comparación con su homólogo humano; este fenómeno se debe al uso de una proteína Mre11 humana trunca para la cristalización, incluyendo únicamente la fracción amino-terminal de la proteína, hasta el aminoácido 411, ya que los intentos de cristalizar la molécula completa no tuvieron éxito (Park et al., 2011). Esto puede deberse a la falta de organización estructural de la porción carboxilo-terminal de Mre11, característica también asociada a la ausencia de dominios funcionales en esta zona.

Ambos genes fueron amplificados y clonados (**figura 6**) para producir sus respectivas proteínas recombinantes bacterianas, y posteriormente verificar la conservación funcional que los análisis *in silico* sugerían. Las proteínas purificadas fueron probadas para algunas de sus actividades bioquímicas descritas en otros estudios. Amex.RAD51 se sometió a pruebas de unión al ADN, presentando la capacidad de unirse a ADN de cadena simple y doble (**figura 7**); esta observación se correlaciona directamente con los análisis realizados con la Rad51 humana (Benson et al., 1994), e indirectamente con la evaluación de la actividad de intercambio de cadenas de su homólogo en *X. laevis* (Maeshima et al., 1996). En concordancia con estos experimentos, se empleó el inhibidor químico B02 como parte de la caracterización de la proteína y también para obtener información sobre su capacidad para inhibir específicamente a Amex.RAD51, ya que esta molécula inhibitoria fue originalmente concebida para trabajar con la Rad51 humana (Huang et al., 2011). Como se puede observar en la **figura 8**, B02 impide la unión al ADN por Amex.RAD51, hecho que concuerda con los estudios realizados por Huang et al., donde describen que B02 inhibe todas las funciones de Rad51, debido a que impide su unión al ADN (Huang et al., 2012; Huang et al., 2011). Nuestros hallazgos confirmaron la hipótesis de conservación de un verdadero homólogo funcional para Rad51 en la salamandra y fortalecieron la potencial inhibición de Amex.RAD51 por B02, cuyo efecto se describe en los ensayos *in vivo*.

En un enfoque bastante similar, Amex.MRE11 demostró conservar las actividades previamente descritas en otros animales (**figura 9**), como la unión al ADN y la

actividad exonucleasa con dirección 3' a 5' (de Jager et al., 2001; De Jager, Wyman, Van Gent, & Kanaar, 2002; Paull & Gellert, 1998). Para catalizar la resección del ADN, la Mre11 humana debe complementarse con el cofactor manganeso (Mn^{2+}), que no es reemplazable con otros cationes divalentes similares, como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+} (Paull & Gellert, 1998; Trujillo & Sung, 2001). Por el contrario, nuestra investigación no confirmó dicha observación, ya que Amex.MRE11 fue capaz de utilizar también Mn^{2+} y el Mg^{2+} , pero con un menor grado de eficiencia en el corte (**figura 9c**). Curiosamente, un comportamiento similar fue observado con la proteína Mre11 de *Pyrococcus furiosus*, que es capaz de utilizar Mg^{2+} para llevar a cabo la función de nucleasa (Hopkins & Paull, 2008). La Mirina es un inhibidor químico identificado al utilizar extractos celulares derivados de huevos de *X. laevis*, que inhibe específicamente la actividad exonucleasa 3' a 5' de Mre11 (Dupre et al., 2008). En nuestros experimentos, pudimos reproducir este efecto con la proteína recombinante, confirmando la capacidad de la Mirina para inhibir a Amex.MRE11 (**figura 10**). Estos resultados no sólo confirmaron la conservación funcional de Mre11 en la salamandra, sino que también sugirieron fuertemente su idoneidad en los posteriores ensayos *in vivo*.

Analizamos el perfil transcripcional de los genes Amex.*Rad51* y Amex.*Mre11*, que presentaron un marcado incremento a los 10 y 7 dpa, respectivamente (**figura 11a y b**). Es importante destacar que estos datos se correlacionan positivamente con los obtenidos al analizar las bases de datos de ARN-seq a lo largo de la regeneración de extremidades, donde ambos genes muestran un patrón similar de aumento en la expresión (**figura 11c y d**) (Caballero-Perez et al., 2018; Stewart et al., 2013). Por otra parte, nuestros datos difieren ligeramente de aquellos reportados por Voss et al., quienes, a través de un robusto experimento con microarreglos a lo largo del proceso de regeneración, encontraron que ambos genes presentan un ligero incremento a partir de los 5 dpa, siendo mayor para Amex.*Rad51*, que se mantiene elevado durante los 28 días que duró el experimento (Voss et al., 2015). Establecimos dos tipos de experimentos, en los que los ajolotes fueron amputados y se les permitió regenerarse hasta el día 28 post-amputación, o hasta la etapa de blastema medio. Durante este lapso, se administró a los animales los inhibidores

B02 o Mirina durante los días establecidos en el esquema de la **figura 11e**. Una de las ventajas del uso de inhibidores químicos es que pueden ser utilizados en momentos puntuales y con concentraciones específicas; resultando, muy útiles para la inhibición transitoria de proteínas que son críticas para la viabilidad celular, como las implicadas en la reparación del ADN (Huang et al., 2012; Kawasumi & Nghiem, 2007). Es importante mencionar que estos dos inhibidores han sido utilizados previamente para tratar el crecimiento tumoral inducido por xenoinjertos en ratones, por lo que empleamos las concentraciones más altas utilizadas en estos estudios, pero que no presentaban ninguna afectación observable en la salud de los ratones (Huang & Mazin, 2014; Petroni et al., 2018). Como se observó en nuestras tinciones de H y E (**figura 13**), B02 produjo una afectación morfológica; sin embargo, para descartar la posibilidad de malformaciones naturales durante la regeneración, como se han observado previamente (Bothe et al., 2021; Diogo et al., 2014; Thompson et al., 2014), y para obtener una mejor comprensión del fenotipo observado, realizamos la determinación de células senescentes. Estas células son una población celular multifacética que se caracteriza principalmente por su exclusión del ciclo celular en respuesta a una variedad de estímulos (revisado en (M. H. Yun, 2018). Con este análisis las extremidades tratadas con B02 mostraron un fuerte aumento en el número de células positivas a senescencia, en contraste con Mirina donde el efecto no fue tan evidente en las extremidades tratadas. En este contexto, se ha demostrado que las células senescentes participan activamente durante el desarrollo de *A. mexicanum* y *X. laevis*, donde se ha sugerido su participación en la degeneración y remodelación de los tejidos (Davaapil et al., 2017; Villiard et al., 2017). Cabe destacar que, durante la regeneración de extremidades en el ajolote, el número de células senescentes aumenta durante el proceso, alcanzando su punto máximo en la etapa de blastema medio. Después de este punto, disminuyen gradualmente hasta ser prácticamente indetectables en las extremidades regeneradas (Maximina H. Yun et al., 2015). En contraste con el comportamiento natural de estas células durante la regeneración, en nuestro análisis el número de células senescentes sigue siendo alto incluso a los 28 dpa, cuando el inhibidor B02 fue aplicado (**figura 14**). Se ha establecido que las células senescentes también

pueden surgir debido a la acumulación de daños irreparables en el ADN, llevando a la célula a un estado no proliferativo para evitar la propagación de alteraciones genómicas (revisado en (M. H. Yun, 2018)). En consecuencia, el fenómeno obtenido con el inhibidor B02 podría ser resultado de la acumulación de daños en el ADN, ya que B02 es capaz de impedir el proceso de recombinación homóloga en las células (Huang et al., 2012). Por lo tanto, alterando la reparación de los daños en el ADN que se producen de forma natural, consecuencia de las características genéticas del ajolote descritas anteriormente, como el tamaño del genoma, el contenido de secuencias repetidas y la aceleración del ciclo celular (Nowoshilow et al., 2018; Rost & Rodrigo Albors, 2016). Alternativamente, este número alto de células senescentes podría deberse a que el inhibidor afecta a los macrófagos que se encuentran en el blastema, ya que estos están directamente implicados en la eliminación de las células senescentes (M. H. Yun, 2018; Maximina H. Yun et al., 2015)

Para analizar el efecto de los fármacos B02 y Mirina a nivel molecular, nos planteamos la hipótesis de que podrían tener un mayor efecto al momento de su aplicación, por lo que establecimos los grupos 3 y 4, los cuales fueron re-amputados tras la última administración, es decir, a los 12 dpa para B02 y 11 dpa para Mirina (**figura 15**). En estos experimentos, pudimos observar un aumento significativo en el número de células γ H2AX positivas en el blastema medio, con ambos inhibidores y en comparación con el control, el cual presenta un nivel natural basal de fosforilación de la histona, previamente observado durante la regeneración en el ajolote (Sousounis et al., 2020). Para el caso de B02, este aumento en el daño al ADN revelado por la marca γ H2AX podría ser el desencadenante de la formación de células senescentes, observada a los 28 dpa (**figura 14**). Durante la vía de reparación por HR, se puede observar que Rad51 actúa en los pasos finales de la vía, donde invade la cadena homóloga para restaurar el daño (Mladenov et al., 2016); por lo tanto, si Rad51 es inhibido por B02, la HR no puede progresar (Huang et al., 2012) y el daño no será reparado. En este contexto, no se ha determinado si en esta situación la reparación puede proceder a través de otro mecanismo, como NHEJ, sin embargo nuestros resultados sugieren que estas células podrían volverse senescentes y persistir durante la regeneración debido a daño irreparable en el ADN

(Garcia-Lepe et al., 2021). Otro argumento que apoya nuestra hipótesis es que cuando se aplicó B02 en ratones para tratar tumores, el inhibidor por sí solo no fue capaz de producir una reducción del crecimiento tumoral (Huang & Mazin, 2014), lo que indica que B02 no mata directamente las células. Por lo tanto, si extrapolamos esta observación a las células del blastema, que presentan características reminiscentes a las de las células cancerosas (Oviedo & Beane, 2009), es posible que B02 tampoco esté matando a las células de blastema, sino que esté forzando a las células a repararse por otros medios o a volverse senescentes para evitar la acumulación de daños en el ADN (Mani, Reddy, & Palle, 2020; Sperka, Wang, & Rudolph, 2012).

Además, el aumento en la señal de γ H2AX en nuestro experimento coincide plenamente con la observación realizada por Jin et al., quienes obtuvieron el mismo fenotipo cuando se utilizó B02 en ovocitos porcinos (Jin & Kim, 2017). Las observaciones obtenidas con el inhibidor Mirina resultan interesantes ya que no replicaron el efecto de B02 en cuanto a la aparición de células senescentes a los 28 dpa. Aun así, sí produjo un aumento de la señal de γ H2AX en la etapa de blastema medio, lo que indica que ambas cadenas de ADN están rotas en este punto; pero a diferencia de B02, esta lesión no se traduce en un aumento drástico de la senescencia, lo que sugiere que el daño podría ser reparado posiblemente por otras vías. En la vía de la HR, Mre11; el blanco de la Mirina, ejerce sus funciones al principio del proceso (**figura 4**) (Mladenov et al., 2016), en un punto que puede considerarse una bifurcación, guiando hacia otras rutas cuando la HR está comprometida o inhibida, como con la Mirina (Dupre et al., 2008). De hecho, se ha determinado que cuando Mre11 está inhibida, el mecanismo de reparación puede proceder a través de la vía poco fiable NHEJ (Shibata et al., 2014); por lo tanto, es posible que las rupturas de ADN en el blastema estén siendo reparadas por NHEJ u otra vía, permitiendo así que la regeneración avance y se evite la aparición de células senescentes, como se observó con B02. Sin embargo, existen varios informes que postulan resultados contradictorios sobre el efecto que la Mirina produce, respecto a la fosforilación de la histona H2AX. Mientras que algunas publicaciones afirman que la Mirina provoca una reducción de la señal de γ H2AX,

debido a la afectación en la ruta de activación de ATM dependiente de MRN (Dupre et al., 2008; Sandoval-Cabrera, Zarzosa-Alvarez, Martinez-Miguel, & Bermudez-Cruz, 2015), otros no han observado este resultado; por el contrario, informan de un aumento de esta señal cuando se utilizó el inhibidor (Petroni et al., 2018; Shibata et al., 2014), datos que coinciden con los hallazgos que reportamos en nuestra investigación. Estas observaciones podrían encontrar explicación en las diferentes rutas por las que se activa la ATM, las cuales pueden o no ser dependientes del complejo MRN (Dupre, Boyer-Chatenet, & Gautier, 2006; Dupre et al., 2008), por lo que es necesaria más investigación para aclarar estas discrepancias. La localización ectópica de la señal de γ H2AX fue un resultado curioso, ya que normalmente se espera que la histona modificada se localice dentro del núcleo, sin embargo, hay algunos informes que indican esta posibilidad. En estas investigaciones, γ H2AX se encuentra en el citoplasma debido a la sobreexpresión de la enzima cinasa A relacionada con la tropomiosina, una proteína implicada en la supervivencia celular, la diferenciación y la apoptosis, que también regula elementos relevantes del ciclo celular, como P53 y P21 (Jung et al., 2008; Jung & Kim, 2011). Detectamos la localización citoplasmática de γ H2AX principalmente en el tejido epidérmico, una observación que coincide con los resultados reportados por Sousounis et al., quienes observaron la señal de γ H2AX en este mismo tejido durante la regeneración, incluyendo el núcleo y el citoplasma (Sousounis et al., 2020). Naturalmente, se necesita una investigación más profunda para dilucidar el papel de γ H2AX fuera del núcleo y su relación con la regeneración del tejido.

10. Conclusiones

De forma general, concluimos que el estudio de los mecanismos de reparación del ADN en el ajolote era hasta ahora un área prácticamente inexplorada, con muy pocas investigaciones enfocadas directamente en la estabilidad del genoma a lo largo de las sucesivas divisiones celulares que ocurren durante la regeneración, a pesar de que se han descrito múltiples características interesantes relacionadas con este tema en la salamandra. En este sentido, los hallazgos de este estudio

representan la primera aproximación que describe la conservación funcional de elementos esenciales de la vía de recombinación homóloga. Además, confirmamos su participación e importancia durante la regeneración de las extremidades, donde la inhibición química induce rupturas de doble cadena que conducen a la senescencia asociada al daño en el ADN, o de forma alternativa, este daño podría ser reparado por una vía adyacente de reparación del ADN, permitiendo una correcta regeneración y evitando la senescencia.

Las conclusiones específicas de este trabajo son:

1. La secuencia de Amex.*Rad51* tiene un porcentaje de identidad del 95 % respecto a la de humano.
2. La secuencia de Amex.*Mre11* tiene un porcentaje de identidad del 74 % respecto a la de humano.
3. Amex.RAD51 presenta la capacidad para unirse a ADN de cadena sencilla y cadena doble.
4. El fármaco B02 inhibe eficientemente la capacidad de Amex.RAD51 para interactuar con el ADN.
5. Amex.MRE11 presenta las actividades de unión al ADN y exonucleasa con polaridad 3' a 5'.
6. El fármaco Mirina inhibe la actividad exonucleasa de Amex.MRE11.
7. Los transcritos de Amex.*Rad51* y Amex.*Mre11* presentan un incremento durante la etapa de blastema medio.
8. El inhibidor B02 es capaz de producir un aumento en el número de células senescentes durante el proceso de regeneración a los 28 dpa.
9. El inhibidor B02 provoca un leve retraso en el proceso de regeneración a los 28 dpa.
10. Es posible que el inhibidor Mirina este provocando que los daños al ADN se reparen mediante una vía alternativa, por lo tanto, evitando la generación de células senescentes.
11. Los inhibidores B02 y Mirina provocan un aumento en la señalización de DSBs (γ H2AX) durante su aplicación en la etapa de blastema medio.

11. Bibliografía

- Benson, F. E., Stasiak, A., & West, S. C. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J*, *13*(23), 5764-5771.
- Bothe, V., Mahlow, K., & Frobisch, N. B. (2021). A histological study of normal and pathological limb regeneration in the Mexican axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, *336*(2), 116-128. doi:10.1002/jez.b.22950
- Branzei, D., & Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(3), 208-219. doi:10.1038/nrm2852
- Bryant, D. M., Sousounis, K., Farkas, J. E., Bryant, S., Thao, N., Guzikowski, A. R., . . . Whited, J. L. (2017). Repeated removal of developing limb buds permanently reduces appendage size in the highly-regenerative axolotl. *Dev Biol*, *424*(1), 1-9. doi:10.1016/j.ydbio.2017.02.013
- Caballero-Perez, J., Espinal-Centeno, A., Falcon, F., Garcia-Ortega, L. F., Curiel-Quesada, E., Cruz-Hernandez, A., . . . Cruz-Ramirez, A. (2018). Transcriptional landscapes of Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Biol*, *433*(2), 227-239. doi:10.1016/j.ydbio.2017.08.022
- Costa, E. C., Otsuki, L., Albors, A. R., Tanaka, E. M., & Chara, O. J. E. (2021). Spatiotemporal control of cell cycle acceleration during axolotl spinal cord regeneration. *10*, e55665.
- Costanzo, V., Robertson, K., Bibikova, M., Kim, E., Grieco, D., Gottesman, M., . . . Gautier, J. (2001). Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell*, *8*(1), 137-147. doi:10.1016/s1097-2765(01)00294-5
- d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*, *8*(7), 512-522. doi:10.1038/nrc2440
- Davaapil, H., Brockes, J. P., & Yun, M. H. (2017). Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development*, *144*(1), 106-114. doi:10.1242/dev.138222
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D. C., Dekker, C., Kanaar, R., & Wyman, C. J. M. c. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *8*(5), 1129-1135.
- De Jager, M., Wyman, C., Van Gent, D. C., & Kanaar, R. J. N. a. r. (2002). DNA end-binding specificity of human Rad50/Mre11 is influenced by ATP. *30*(20), 4425-4431.
- Diogo, R., Nacu, E., & Tanaka, E. M. (2014). Is salamander limb regeneration really perfect? Anatomical and morphogenetic analysis of forelimb muscle regeneration in GFP-transgenic axolotls as a basis for regenerative, developmental, and evolutionary studies. *Anat Rec (Hoboken)*, *297*(6), 1076-1089. doi:10.1002/ar.22906
- Dupre, A., Boyer-Chatenet, L., & Gautier, J. (2006). Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Struct Mol Biol*, *13*(5), 451-457. doi:10.1038/nsmb1090
- Dupre, A., Boyer-Chatenet, L., Sattler, R. M., Modi, A. P., Lee, J. H., Nicolette, M. L., . . . Gautier, J. (2008). A forward chemical genetic screen reveals an

- inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol*, 4(2), 119-125. doi:10.1038/nchembio.63
- Elliott, B., & Jasin, M. (2001). Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 21(8), 2671-2682. doi:10.1128/MCB.21.8.2671-2682.2001
- Espinal-Centeno, A., Dipp-Alvarez, M., Saldana, C., Bako, L., & Cruz-Ramirez, A. (2020). Conservation analysis of core cell cycle regulators and their transcriptional behavior during limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Mech Dev*, 164, 103651. doi:10.1016/j.mod.2020.103651
- Fankhauser, G., & Humphrey, R. R. J. T. B. B. (1942). Induction of triploidy and haploidy in axolotl eggs by cold treatment. 83(3), 367-374.
- Farkas, J. E., & Monaghan, J. R. (2015). Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. *Methods Mol Biol*, 1290, 27-46. doi:10.1007/978-1-4939-2495-0_3
- Frost, S. K., Epp, L. G., & Robinson, S. J. (1984). The pigmentary system of developing axolotls. II. An analysis of the melanoid phenotype. *J Embryol Exp Morphol*, 81, 127-142.
- Garcia-Lepe, U. O., Cruz-Ramirez, A., & Bermudez-Cruz, R. M. (2021). DNA repair during regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Dev Dyn*, 250(6), 788-799. doi:10.1002/dvdy.276
- Garcia, V., Phelps, S. E., Gray, S., & Neale, M. J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature*, 479(7372), 241-244. doi:10.1038/nature10515
- Gerber, T., Murawala, P., Knapp, D., Masselink, W., Schuez, M., Hermann, S., . . . Treutlein, B. (2018). Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. *Science*, 362(6413), eaaq0681. doi:10.1126/science.aaq0681
- Gouet, P., Robert, X., & Courcelle, E. (2003). ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3320-3323. doi:10.1093/nar/gkg556
- Guelke, E., Bucan, V., Liebsch, C., Lazaridis, A., Radtke, C., Vogt, P. M., & Reimers, K. (2015). Identification of reference genes and validation for gene expression studies in diverse axolotl (*Ambystoma mexicanum*) tissues. *Gene*, 560(1), 114-123. doi:10.1016/j.gene.2015.01.030
- Gupta, R. C., Bazemore, L. R., Golub, E. I., & Radding, C. M. (1997). Activities of human recombination protein Rad51. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(2), 463-468. doi:10.1073/pnas.94.2.463
- Haas, B. J., & Whited, J. L. (2017). Advances in Decoding Axolotl Limb Regeneration. *Trends Genet*, 33(8), 553-565. doi:10.1016/j.tig.2017.05.006
- Habermann, B., Bebin, A. G., Herklotz, S., Volkmer, M., Eckelt, K., Pehlke, K., . . . Tanaka, E. M. (2004). An *Ambystoma mexicanum* EST sequencing project: analysis of 17,352 expressed sequence tags from embryonic and regenerating blastema cDNA libraries. *Genome Biol*, 5(9), R67. doi:10.1186/gb-2004-5-9-r67
- Hashimoto, Y., Ray Chaudhuri, A., Lopes, M., & Costanzo, V. (2010). Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes

- continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol*, 17(11), 1305-1311.
doi:10.1038/nsmb.1927
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*, 28(6), 436-453.
doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001
- Hills, S. A., & Diffley, J. F. (2014). DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol*, 24(10), R435-444.
doi:10.1016/j.cub.2014.04.012
- Hittelman, W. N., & Pollard, M. (1982). A comparison of the DNA and chromosome repair kinetics after gamma irradiation. *Radiat Res*, 92(3), 497-509.
- Hopfner, K. P., Putnam, C. D., & Tainer, J. A. (2002). DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr Opin Struct Biol*, 12(1), 115-122.
doi:10.1016/s0959-440x(02)00297-x
- Hopkins, B. B., & Paull, T. T. (2008). The P. furiosus mre11/rad50 complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break. *Cell*, 135(2), 250-260. doi:10.1016/j.cell.2008.09.054
- Huang, F., & Mazin, A. V. (2014). A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts. *PLoS One*, 9(6), e100993. doi:10.1371/journal.pone.0100993
- Huang, F., Mazina, O. M., Zentner, I. J., Cocklin, S., & Mazin, A. V. (2012). Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. *J Med Chem*, 55(7), 3011-3020. doi:10.1021/jm201173g
- Huang, F., Motlekar, N. A., Burgwin, C. M., Napper, A. D., Diamond, S. L., & Mazin, A. V. (2011). Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. *ACS Chem Biol*, 6(6), 628-635. doi:10.1021/cb100428c
- Huggins, P., Johnson, C. K., Schoergendorfer, A., Putta, S., Bathke, A. C., Stromberg, A. J., & Voss, S. R. (2012). Identification of differentially expressed thyroid hormone responsive genes from the brain of the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 155(1), 128-135. doi:10.1016/j.cbpc.2011.03.006
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J., & Jackson, S. P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 8(1), 37-45. doi:10.1038/ncb1337
- Jin, Z. L., & Kim, N. H. (2017). RAD51 maintains chromosome integrity and mitochondrial distribution during porcine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Dev*, 63(5), 489-496. doi:10.1262/jrd.2017-078
- Jung, E. J., Kim, C. W., & Kim, D. R. (2008). Cytosolic accumulation of gammaH2AX is associated with tropomyosin-related kinase A-induced cell death in U2OS cells. *Exp Mol Med*, 40(3), 276-285.
doi:10.3858/emm.2008.40.3.276
- Jung, E. J., & Kim, D. R. (2011). Ectopic expression of H2AX protein promotes TrkA-induced cell death via modulation of TrkA tyrosine-490 phosphorylation and JNK activity upon DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*, 404(3), 841-847. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.072

- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 30(4), 772-780. doi:10.1093/molbev/mst010
- Kawasumi, M., & Nghiem, P. (2007). Chemical genetics: elucidating biological systems with small-molecule compounds. *J Invest Dermatol*, 127(7), 1577-1584. doi:10.1038/sj.jid.5700853
- Kinoshita, E., van der Linden, E., Sanchez, H., & Wyman, C. (2009). RAD50, an SMC family member with multiple roles in DNA break repair: how does ATP affect function? *Chromosome Res*, 17(2), 277-288. doi:10.1007/s10577-008-9018-6
- Knapp, D., Schulz, H., Rascon, C. A., Volkmer, M., Scholz, J., Nacu, E., . . . Tanaka, E. M. (2013). Comparative transcriptional profiling of the axolotl limb identifies a tripartite regeneration-specific gene program. *PLoS One*, 8(5), e61352. doi:10.1371/journal.pone.0061352
- Kumar, A., Simon, A., & Kumar. (2015). *Salamanders in regeneration research*: Springer.
- Lafrance-Vanasse, J., Williams, G. J., & Tainer, J. A. (2015). Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. *Prog Biophys Mol Biol*, 117(2-3), 182-193. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.004
- Larocque, J. R., & Jasin, M. (2010). Mechanisms of recombination between diverged sequences in wild-type and BLM-deficient mouse and human cells. *Mol Cell Biol*, 30(8), 1887-1897. doi:10.1128/MCB.01553-09
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715. doi:10.1038/362709a0
- Liu, P., Carvalho, C. M., Hastings, P., Lupski, J. R. J. C. o. i. g., & development. (2012). Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. 22(3), 211-220.
- Liu, Y., Zou, R. S., He, S., Nihongaki, Y., Li, X., Razavi, S., . . . Ha, T. (2020). Very fast CRISPR on demand. *Science*, 368(6496), 1265-1269. doi:10.1126/science.aay8204
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., . . . Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res*, 48(D1), D265-D268. doi:10.1093/nar/gkz991
- Maeshima, K., Morimatsu, K., & Horii, T. (1996). Purification and characterization of XRad51.1 protein, Xenopus RAD51 homologue: recombinant XRad51.1 promotes strand exchange reaction. *Genes Cells*, 1(12), 1057-1068. doi:10.1046/j.1365-2443.1996.d01-224.x
- Mani, C., Reddy, P. H., & Palle, K. (2020). DNA repair fidelity in stem cell maintenance, health, and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866(4), 165444. doi:10.1016/j.bbadis.2019.03.017
- Matsuo, Y., Sakane, I., Takizawa, Y., Takahashi, M., & Kurumizaka, H. (2006). Roles of the human Rad51 L1 and L2 loops in DNA binding. *FEBS J*, 273(14), 3148-3159. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05323.x

- Mirkin, E. V., & Mirkin, S. M. (2007). Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(1), 13-35. doi:10.1128/MMBR.00030-06
- Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., & Iliakis, G. (2016). DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin Cancer Biol*, 37-38, 51-64. doi:10.1016/j.semcancer.2016.03.003
- Mockel, C., Lammens, K., Schele, A., & Hopfner, K. P. (2012). ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex. *Nucleic Acids Res*, 40(2), 914-927. doi:10.1093/nar/gkr749
- Myers, J. S., & Cortez, D. (2006). Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J Biol Chem*, 281(14), 9346-9350. doi:10.1074/jbc.M513265200
- Namsaraev, E., & Berg, P. (1997). Characterization of strand exchange activity of yeast Rad51 protein. *Mol Cell Biol*, 17(9), 5359-5368. doi:10.1128/MCB.17.9.5359
- Nowoshilow, S., Fei, J. F., Voss, S. R., Tanaka, E. M., & Murawala, P. (2021). Gene and transgenics nomenclature for the laboratory axolotl-Ambystoma mexicanum. *Dev Dyn*. doi:10.1002/dvdy.351
- Nowoshilow, S., Schloissnig, S., Fei, J. F., Dahl, A., Pang, A. W. C., Pippel, M., . . . Myers, E. W. (2018). The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, 554(7690), 50-55. doi:10.1038/nature25458
- Oviedo, N. J., & Beane, W. S. (2009). Regeneration: The origin of cancer or a possible cure? *Semin Cell Dev Biol*, 20(5), 557-564. doi:10.1016/j.semcdb.2009.04.005
- Page, R. B., Voss, S. R., Samuels, A. K., Smith, J. J., Putta, S., & Beachy, C. K. (2008). Effect of thyroid hormone concentration on the transcriptional response underlying induced metamorphosis in the Mexican axolotl (Ambystoma). *BMC Genomics*, 9, 78. doi:10.1186/1471-2164-9-78
- Park, Y. B., Chae, J., Kim, Y. C., & Cho, Y. (2011). Crystal structure of human Mre11: understanding tumorigenic mutations. *Structure*, 19(11), 1591-1602. doi:10.1016/j.str.2011.09.010
- Paull, T. T. (2018). 20 Years of Mre11 Biology: No End in Sight. *Mol Cell*, 71(3), 419-427. doi:10.1016/j.molcel.2018.06.033
- Paull, T. T., & Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 1(7), 969-979. doi:10.1016/s1097-2765(00)80097-0
- Petroni, M., Sardina, F., Infante, P., Bartolazzi, A., Locatelli, E., Fabretti, F., . . . Giannini, G. (2018). MRE11 inhibition highlights a replication stress-dependent vulnerability of MYCN-driven tumors. *Cell Death Dis*, 9(9), 895. doi:10.1038/s41419-018-0924-z
- Prado, F. (2018). Homologous Recombination: To Fork and Beyond. *Genes (Basel)*, 9(12). doi:10.3390/genes9120603
- Renodon-Corniere, A., Takizawa, Y., Conilleau, S., Tran, V., Iwai, S., Kurumizaka, H., & Takahashi, M. (2008). Structural analysis of the human Rad51 protein-DNA complex filament by tryptophan fluorescence scanning analysis:

- transmission of allosteric effects between ATP binding and DNA binding. *J Mol Biol*, 383(3), 575-587. doi:10.1016/j.jmb.2008.08.030
- Reymer, A., Frykholm, K., Morimatsu, K., Takahashi, M., & Norden, B. (2009). Structure of human Rad51 protein filament from molecular modeling and site-specific linear dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(32), 13248-13253. doi:10.1073/pnas.0902723106
- Rodrigo Albors, A., Tazaki, A., Rost, F., Nowoshilow, S., Chara, O., & Tanaka, E. M. (2015). Planar cell polarity-mediated induction of neural stem cell expansion during axolotl spinal cord regeneration. *Elife*, 4, e10230. doi:10.7554/eLife.10230
- Rost, F., & Rodrigo Albors, A. (2016). Accelerated cell divisions drive the outgrowth of the regenerating spinal cord in axolotls. 5. doi:10.7554/eLife.20357
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 5(4), 725-738. doi:10.1038/nprot.2010.5
- Roy, S., & Levesque, M. (2006). Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? *ScientificWorldJournal*, 6 Suppl 1, 12-25. doi:10.1100/tsw.2006.324
- Sandoval-Cabrera, A., Zarzosa-Alvarez, A. L., Martinez-Miguel, R. M., & Bermudez-Cruz, R. M. (2015). MR (Mre11-Rad50) complex in *Giardia duodenalis*: In vitro characterization and its response upon DNA damage. *Biochimie*, 111, 45-57. doi:10.1016/j.biochi.2015.01.008
- Sandoval-Guzman, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., . . . Simon, A. (2014). Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell*, 14(2), 174-187. doi:10.1016/j.stem.2013.11.007
- Shaffer, H. B. J. A. N. (1989). Natural history, ecology, and evolution of the Mexican "Axolotls". 18, 5-11.
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A. S., Perry, J., Harding, S. M., Genoio, M. M., . . . Tainer, J. A. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol Cell*, 53(1), 7-18. doi:10.1016/j.molcel.2013.11.003
- Simon, A., & Tanaka, E. M. (2013). Limb regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(2), 291-300. doi:10.1002/wdev.73
- Sonoda, E., Sasaki, M. S., Buerstedde, J. M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., . . . Takeda, S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J*, 17(2), 598-608. doi:10.1093/emboj/17.2.598
- Sousounis, K., Bryant, D. M., Martinez Fernandez, J., Eddy, S. S., Tsai, S. L., Gundberg, G. C., . . . Whited, J. L. (2020). Eya2 promotes cell cycle progression by regulating DNA damage response during vertebrate limb regeneration. *Elife*, 9, e51217. doi:10.7554/eLife.51217
- Spallanzani, A. (1769). Reproductions of the legs in the aquatic salamander. *An essay on animal reproductions. London: Becket and de Hondt*, 68-82.
- Sperka, T., Wang, J., & Rudolph, K. L. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(9), 579-590. doi:10.1038/nrm3420

- Stewart, R., Rascon, C. A., Tian, S., Nie, J., Barry, C., Chu, L. F., . . . Dewey, C. N. (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. doi:10.1371/journal.pcbi.1002936
- Stinson, B. M., & Loparo, J. J. (2021). Repair of DNA Double-Strand Breaks by the Nonhomologous End Joining Pathway. *Annu Rev Biochem*, *90*, 137-164. doi:10.1146/annurev-biochem-080320-110356
- Stocum, D. L. (2019). Mechanisms of Blastema Formation and Growth in Regenerating Urodele Limbs. In *Principles of Regenerative Medicine* (pp. 37-48): Elsevier.
- Story, R. M., Weber, I. T., & Steitz, T. A. (1992). The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer. *Nature*, *355*(6358), 318-325. doi:10.1038/355318a0
- Stracker, T. H., & Petrini, J. H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(2), 90-103. doi:10.1038/nrm3047
- Sun, Y., McCorvie, T. J., Yates, L. A., & Zhang, X. (2020). Structural basis of homologous recombination. *Cell Mol Life Sci*, *77*(1), 3-18. doi:10.1007/s00018-019-03365-1
- Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(10), 739-750. doi:10.1038/nrm2008
- Syed, A., & Tainer, J. A. (2018). The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem*, *87*, 263-294. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012415
- Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev*, *66*(4), 630-670, table of contents. doi:10.1128/MMBR.66.4.630-670.2002
- Tank, P. W., Carlson, B. M., & Connelly, T. G. (1976). A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J Morphol*, *150*(1), 117-128. doi:10.1002/jmor.1051500106
- Techer, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A., & Debatisse, M. (2017). The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat Rev Genet*, *18*(9), 535-550. doi:10.1038/nrg.2017.46
- Thompson, S., Muzinic, L., Muzinic, C., Niemiller, M. L., & Voss, S. R. (2014). Probability of Regenerating a Normal Limb After Bite Injury in the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Regeneration (Oxf)*, *1*(3), 27-32. doi:10.1002/reg2.17
- Trujillo, K. M., & Sung, P. (2001). DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50* Mre11 complex. *J Biol Chem*, *276*(38), 35458-35464. doi:10.1074/jbc.M105482200
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., . . . Morita, T. (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(13), 6236-6240. doi:10.1073/pnas.93.13.6236
- Vassilev, A., & DePamphilis, M. L. (2017). Links between DNA Replication, Stem Cells and Cancer. *Genes (Basel)*, *8*(2). doi:10.3390/genes8020045

- Villiard, E., Denis, J. F., Hashemi, F. S., Igelmann, S., Ferbeyre, G., & Roy, S. (2017). Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of anamniotes. *Biol Open*, 6(6), 891-896. doi:10.1242/bio.025809
- Vitale, I., Manic, G., De Maria, R., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2017). DNA Damage in Stem Cells. *Mol Cell*, 66(3), 306-319. doi:10.1016/j.molcel.2017.04.006
- Voss, S. R., Palumbo, A., Nagarajan, R., Gardiner, D. M., Muneoka, K., Stromberg, A. J., & Athippozhy, A. T. (2015). Gene expression during the first 28 days of axolotl limb regeneration I: Experimental design and global analysis of gene expression. *Regeneration (Oxf)*, 2(3), 120-136. doi:10.1002/reg2.37
- Williams, G. J., Lees-Miller, S. P., & Tainer, J. A. (2010). Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 9(12), 1299-1306. doi:10.1016/j.dnarep.2010.10.001
- Xu, J., Zhao, L., Xu, Y., Zhao, W., Sung, P., & Wang, H. W. (2017). Cryo-EM structures of human RAD51 recombinase filaments during catalysis of DNA-strand exchange. *Nat Struct Mol Biol*, 24(1), 40-46. doi:10.1038/nsmb.3336
- Yamaguchi-Iwai, Y., Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., . . . Price, C. J. T. E. j. (1999). Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *18(23)*, 6619-6629.
- Yun, M. H. (2018). Cellular senescence in tissue repair: every cloud has a silver lining. *Int J Dev Biol*, 62(6-7-8), 591-604. doi:10.1387/ijdb.180081my
- Yun, M. H., Davaapil, H., & Brookes, J. P. (2015). Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *Elife*, 4, e05505. doi:10.7554/eLife.05505
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7(1-2), 203-214. doi:10.1089/10665270050081478