



Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, mención Biología Celular y
Molecular

TESIS DOCTORAL

“ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS TEMPRANOS DEL TRANSCRIPTOMA EN RESPUESTA AL DAÑO EN LA MÉDULA ESPINAL DE XENOPUS LAEVIS”

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Celular y Molecular.

Por

JOHANY FREDDY PEÑAILILLO LAZO

Director de Tesis: Juan Larraín

Noviembre – 2019

Para Leonardo... mi pequeño, curioso e inquieto, gran dinosaurio

En primer lugar me gustaría agradecer a mi familia, creo que sin su apoyo, tiempo y comprensión nada de esto sería posible. Esta etapa comenzó también con el desafío de convertirnos en padre y madre del pequeño LeonarDitto, Stephanie te doy las gracias y las respectivas disculpas por las ocasiones en que pudiste sentirte sobrecargada durante este periodo. A mi pequeño Therizinosaurus gracias por ser tan tú, tal vez por ahora no comprendas del todo lo que esto significa para mí, pero eres una parte fundamental de mi puzzle, tus locuras que me alegran los días, tus curiosidades y obsesiones que me recuerdan que hay tanto por aprender... creo que en mi vida había sabido tanto de dinosaurios como ahora.

A mis padres, sin su apoyo no estaría aquí hoy, y aunque estemos más distantes, geográficamente, siempre han estado para mí cuando los he necesitado. A mis hermanas, que aunque no nos veamos tan a menudo, cuando estamos juntos aún me hacen sentir como un niño, entre nuestros momentos y los juegos con los chuckies (Pudín, Benja y Ángel).

En segundo lugar, me gustaría agradecer a Juan, por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio y desarrollarme en temáticas y metodologías de gran interés para mí, así como también por su apoyo durante todo este proceso.

A JAL Lab, miembros pasados, Dasfne, Gabriela, Rosana, Kathy, Fernando, Emilio, Daniel, Héctor y Victor, gracias por los buenos momentos y la buena disposición cada vez que fue necesaria. Entre ellos mención honrosa a la señorita... perdón señora Constanza, muchas gracias por las lindas IFIs y por aguantarme todo el tiempo que trabajamos juntos. Miembros actuales, Max (El más cotizador y bkn Lab Manager), Miriam (La mejor Mimi del mundo), Mauricio (El mejor compañero de congresos), Sol, Claudia, Kari, Patty, Paula y Dani, gracias por hacer juntos de este un gran espacio de trabajo y convivencia. También me gustaría agradecer al Dr. Michael Gilchrist por haberme recibido en su laboratorio, y a Elena e Ilya por toda su dedicación en este trabajo y durante mi estancia en su laboratorio.

A mis amigos, Pipe, Dra. Pali, Grillo, Javy y Pingüino, gracias por estar siempre presentes, tal vez no nos vemos tanto como antes, pero cuando lo hacemos todo es como siempre. Pipe... nuestra cheverisidad está intacta jajaja.

Finalmente agradezco a Conicyt por el financiamiento otorgado para mis estudios de doctorado y el desarrollo de esta tesis (Beca de Doctorado Nacional 2014 #21140993 y Beca Asistencia a Eventos y Cursos Cortos 2015).

Índice General

Índice General	I
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	VI
Resumen	VII
Abstract	X
1 Introducción	1
1.1 Regeneración del sistema nervioso central en mamíferos	1
1.2 Lesiones del sistema nervioso central en mamíferos.....	2
1.3 <i>Xenopus laevis</i> y su uso como modelo de regeneración de médula espinal	3
1.4 Mecanismos de señalización temprana en respuesta a daño.....	6
1.5 Estudio de los cambios tempranos del transcriptoma en modelos regenerativos	10
1.6 Bioinformática y secuenciación masiva: combinando herramientas para responder grandes preguntas.....	12
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo General.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 Materiales y Metodologías	17
3.1 Materiales.....	17
3.1.1 Reactivos e insumos generales	17
3.1.2 Soluciones y Amortiguadores	18
3.2 Metodologías	19
3.2.1 Manejo de animales	20
3.2.2 Condiciones experimentales y procedimientos quirúrgicos	22
3.2.3 Perfiles de alta resolución temporal.....	23
3.2.3.1 Muestreo	23
3.2.3.2 Sincronización del muestreo.....	25
3.2.3.3 Preparación de librerías	27
3.2.4 Procesamiento bioinformático de las secuenciaciones	28
3.2.4.1 Determinación de calidad de secuencias	28
3.2.4.2 Determinación de abundancia de transcritos	29
3.2.4.3 Evaluación de reproducibilidad y consistencia.....	29
3.2.4.4 Remoción de efectos de lote (<i>Batch effect</i>)	30
3.2.4.5 Evaluación de expresión diferencial	30
3.2.4.6 Análisis de redes de co-expresión génica ponderada.....	33
3.2.4.7 Análisis de enriquecimiento de ontología génica	34
3.2.4.8 Análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG.....	36
3.2.4.9 Análisis de enriquecimiento de motivos (Analysis of Motif Enrichment, AME)	37
3.2.4.10 Construcción de redes de interacción proteína-proteína.....	37
3.2.5 Validación de genes y vías de señalización	38
3.2.5.1 Transcripción Reversa (RT) y PCR cuantitativo (qPCR).....	38

3.2.5.2 Western Blot	40
3.2.5.3 Criosecciones	41
3.2.5.4 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	42
3.2.5.5 Co-electroporación de vectores plasmidiales	43
3.2.5.6 Ensayos de recuperación de nado	44
4 Resultados	45
4.1 Identificación de los cambios globales del transcriptoma desplegados en la médula espinal durante las primeras 21 horas posteriores al daño	45
4.1.1 Obtención de material biológico	45
4.1.2 Preparación y secuenciación de librerías	46
4.1.3 Mapeo de librerías a base de datos de transcritos	47
4.1.4 Evaluación de ensayo piloto	48
4.1.5 Evaluación de consistencia y reproducibilidad y remoción de efectos de lote	50
4.1.6 Evaluación de genes diferencialmente expresados en respuesta a un daño a la médula espinal	55
4.2 Realización de análisis bioinformáticos para identificar posibles genes o vías de señalización involucrados en la regeneración de la médula espinal y validar sus cambios mediante técnicas de biología molecular	59
4.2.1 Análisis modular de los GDEs luego de la lesión	59
4.2.2 Análisis de enriquecimiento de Ontología Génica y vías de señalización KEGG	
4.2.2.1 mTOR Signalling	72
4.2.2.2 Genes Temprano Inmediatos (GTIs, Módulo E1)	75
4.2.2.3 Procesamiento de ARNs ribosomales	76
4.2.2.4 Regulación de la pluripotencia de células progenitoras	77
4.2.2.5 Replicación de ADN y ciclo celular	78
4.2.3 Análisis de enriquecimiento de sitios de unión al ADN	78
4.2.4 Construcción de red de interacción proteína-proteína	81
4.2.5 Validación de genes y/o vías de señalización	86
4.3 Determinación de la función de genes y/o vías de señalización en el proceso de regeneración de la médula espinal	95
4.3.1 Smad3 y su participación en la regeneración de la médula espinal	95
4.3.2 Vía de señalización mTOR y su rol en la regeneración de la medula espinal	103
5 Discusión	116
5.1 Identificación de los cambios globales del transcriptoma desplegados en la médula espinal durante las primeras 21 horas posteriores al daño	118
5.1.1 Calidad de muestras de ARN y sus respectivas secuenciaciones	118
5.1.2 Análisis de expresión diferencial	123
5.2 Realización de análisis bioinformáticos para identificar posibles genes o vías de señalización involucrados en la regeneración de la médula espinal y validar sus cambios mediante técnicas de biología molecular	124
5.2.1 Estructuración modular de los cambios tempranos del transcriptoma	124
5.2.2 Análisis de Enriquecimiento de Ontología Génica y Vías de Señalización KEGG	125
5.2.3 Integración de resultados e identificación de blancos de estudio	127
5.2.3.1 Genes Temprano Inmediatos (GTIs, Módulo E1)	127

5.2.3.2 Regulación de la vía de señalización JAK/STAT.....	132
5.2.3.3 Vía de señalización mTOR.....	134
5.2.3.4 Mantenimiento de la pluripotencia en células troncales neurales.....	137
5.2.3.5 Smad3 y la vía TGF- β	139
5.3 Determinación la función de genes y/o vías de señalización en el proceso de regeneración de la médula espinal.....	142
5.3.1 SMAD3 y la vía TGF- β	142
5.3.2 Vía de señalización mTOR.....	143
6 Conclusiones.....	148
7 Referencias.....	150
8 Apéndices.....	171
Apéndice 1.....	171
Apéndice 2.....	176
Apéndice 3.....	177
Apéndice 4.....	183
Apéndice 5.....	205
Apéndice 6.....	213
Apéndice 7.....	217
Apéndice 8.....	223
Apéndice 9.....	226
Apéndice 10.....	230

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de señalización temprana en respuesta a daño	7
Figura 2. Flujograma de trabajo. Se ilustran las etapas de nuestro trabajo y el orden cronológicos según fueron llevadas a cabo.....	19
Figura 3. Características morfológicas de animales en estadios-R	21
Figura 4. Detalles del muestreo de animales.....	24
Figura 5. Esquemización del muestreo de una serie de tiempo 1-3 horas para las condiciones transectado y sham en paralelo	26
Figura 6. Análisis de expresión diferencial usando Procesos Gaussianos	32
Figura 7. Comparación de los niveles de mRNA de <i>socs3</i> utilizando RT-qPCR y RNA-seq	49
Figura 8. Análisis de consistencia y reproducibilidad de las librerías de la condición transectada	51
Figura 9. Análisis de reproducibilidad de las librerías de las condiciones control	52
Figura 10. Comparación de perfiles de expresión génica antes y después de la remoción de efectos de lote.....	54
Figura 11. Visualización global de los niveles de mRNA luego de la lesión	57
Figura 12. Red de co-expresión génica construida con WGCNA.....	60
Figura 13. Módulos Regulados Negativamente	62
Figura 14. Módulos Tempranos Regulados Positivamente.....	63
Figura 15. Módulos Intermedios Regulados Positivamente.....	64
Figura 16. Módulos Tardíos Regulados Positivamente	65
Figura 17. Procesos biológicos enriquecidos en los módulos de co-expresión identificados durante las primeras 21 horas luego del daño.....	68
Figura 18. Funcionales Moleculares enriquecidas en los módulos de co-expresión identificados durante las primeras 21 horas luego del daño	69
Figura 19. Componentes Celulares enriquecidos en los módulos de co-expresión identificados durante las primeras 21 horas luego del daño	70
Figura 20. Esquema de la vía de señalización mTOR	74
Figura 21. Análisis de enriquecimiento de sitios de unión al ADN.....	80
Figura 22. Red de interacción proteína-proteína entre genes diferencialmente expresado.....	82
Figura 23. Red de interacción proteína-proteína entre genes diferencialmente expresados	84
Figura 24. Validación de la expresión del gen <i>fos</i>	87
Figura 25. Validación de la expresión del gen <i>socs3</i>	88
Figura 26. Validación de la expresión del gen <i>fosl</i>	89
Figura 27. Validación de la expresión del gen <i>smad3</i>	90
Figura 28. Validación de la expresión del gen <i>inhba</i>	91
Figura 29. Validación de la expresión del gen <i>runx1</i>	92
Figura 30. Validación de la expresión del gen <i>asmb1_27531</i>	93
Figura 31. Evaluación de la activación del factor de transcripción jun	94
Figura 32. Esquema del modelo humano de la vía de señalización TGF- β	96
Figura 33. Evaluación de los niveles de p-Smad3 luego de la transección.....	98
Figura 34. Comparación de la activación de p-Smad3 en regiones rostral y caudal a la lesión de la médula espinal.....	99
Figura 35. Evaluación de la actividad transcripcional de <i>smad3</i>	102
Figura 36. Daño en la médula espinal induce una temprana y progresiva activación de S6.....	105
Figura 37. Daño en la médula espinal induce una fosforilación transitoria de 4E-BP1.....	106
Figura 38. S6 es activado en motoneuronas y células del canal endimario luego de la transección	108
Figura 39. S6 es activada en células Sox2 positivas cercanas a la zona de transección	109

Figura 40. Evaluación del efecto de rapamicina en la regeneración de la médula espinal	111
Figura 41. Evaluación de recuperación de la capacidad de nado.....	113
Figura 42. Evaluación de la proliferación de células de células troncales en respuesta a la inhibición de la vía mTOR.....	114
Figura 43. Esquema resumen de señalización temprana en la regeneración de la médula espinal	
.....	
.....	141

Índice de Tablas

Tabla 1. Detalles de preparación de librerías Illumina para secuenciación masiva	28
Tabla 2. Reacción utilizada para transcripción reversa.....	38
Tabla 3. Reacción utilizada para reacción de PCR cuantitativo	39
Tabla 4. Partidores utilizados en validaciones por PCR cuantitativo	39
Tabla 5. Anticuerpos	41
Tabla 6. Genes con mayores cambios de expresión luego del daño en la médula espinal.....	58
Tabla 7. Comparación de expresión diferencial entre módulos	66
Tabla 8. Resumen de vías de señalización KEGG identificadas.....	71
Tabla 9. Proteínas con mayor grado de interacciones dentro de la red total.....	83
Tabla 10. Proteínas con mayor grado de interacciones dentro de la red de factores de transcripción .	85

Resumen

A diferencia de los mamíferos, otros animales como las larvas de anfibios anuros (donde se incluye a *Xenopus*) pueden lograr una recuperación funcional completa después de una lesión en la médula espinal. En nuestro laboratorio, se ha establecido a la rana *Xenopus laevis* (*X. laevis*) como un organismo modelo para estudiar la regeneración de la médula espinal. Una de las principales ventajas de *X. laevis* es que las larvas en etapas 50-54 (estadios-R) pueden recuperarse anatómica, histológica y funcionalmente después de una lesión en la médula espinal (LME). Esas habilidades se pierden por completo en las ranas juveniles (estadio-NR). La zona ependimaria del canal central de la médula espinal de las larvas en estadios-R presenta un alto porcentaje de células progenitoras neuronales (NPC) Sox2+. Estas se activan rápidamente en respuesta a una lesión y son necesarias para lograr la regeneración completa de la médula espinal. **Nuestro interés es identificar las redes genéticas y las vías de señalización involucradas en la activación temprana de NPC.**

Para identificar los mecanismos y las vías de señalización involucradas en la activación de células Sox2+, hemos realizado un análisis de los cambios del transcriptoma durante las primeras 21 horas posteriores a la transección (hpt) en animales en estadios-R. Con este objetivo, el tejido del sitio de la lesión se aisló cada 1 hora luego de la lesión en animales transectados, así como también en animales control, con daño simulado (*sham*) y sin daño. Como resultado de este muestreo y posterior secuenciación de ARNm conseguimos más de 100 librerías de RNA-seq, con las cuales se realizó un exhaustivo análisis bioinformático. Los genes expresados diferencialmente (GEDs) se identificaron mediante Procesos Gaussianos. Posteriormente, la estructura modular de los GEDs se infirió utilizando un Análisis de redes de Co-expresión Génica Ponderada (WGCNA). Estos módulos de co-expresión fueron analizados

buscando procesos biológicos y vías de señalización KEGG enriquecidas. Además, analizamos los motivos de unión al ADN de factor de transcripción enriquecidos en el promotor proximal de genes coexpresados y las interacciones proteína-proteína entre los GEDs.

Identificamos 1850 GEDs que se agruparon en 11 módulos de coexpresión (3 regulados negativamente, 2 regulados positivamente con una activación inmediata, 3 regulados positivamente con una activación intermedia y 3 regulados positivamente con una activación tardía). El análisis de ontología génica reportó: (1) un enriquecimiento de los reguladores negativos de la señalización mTOR en los primeros módulos regulados negativamente, (2) un aumento en factores de transcripción en los módulos de activación inmediata, (3) un aumento en los componentes de la biogénesis del ribosoma en módulos de activación intermedia y (4) un aumento en genes asociados a división de células progenitoras y de ciclo celular en módulos de activación tardía.

En base a nuestros análisis bioinformáticos decidimos estudiar el rol de la vía mTOR durante las primeras horas luego de la transección. Análisis por Western Blot e Inmunofluorescencia contra p-S6, la forma activa de un componente intracelular de la vía mTOR, mostraron una activación rápida a las 3 hpt y principalmente en las células de la zona endimaria del canal central cercanas al sitio de la lesión y los cuerpos neuronales a lo largo del sistema nervioso. La inhibición de esta vía de señalización utilizando rapamicina bloquea la proliferación de células Sox2+ y la recuperación funcional después de la LME. Estos resultados sugieren un papel clave para la vía mTOR en la rápida activación de las células Sox2+ para una adecuada recuperación después de la LME en renacuajos.

De esta manera, podemos concluir que identificamos cambios tempranos en el transcriptoma de la médula espinal en respuesta al daño a la médula espinal, los cuales pueden

ser asociados a varios procesos biológicos y vías de señalización que se despliegan en ondas transcripcionales secuenciales después de la LME. Finalmente, análisis bioinformáticos y pruebas funcionales de la vía mTOR sugieren que esta vía de señalización sería clave durante las primeras horas de la regeneración de la médula espinal.

Summary

Unlike mammals, other animals such as anuran amphibian larvae (where *Xenopus* is included) can achieve complete functional recovery after a spinal cord injury. In our laboratory, the frog *Xenopus laevis* (*X. laevis*) has been established as a model organism to study spinal cord regeneration. One of the main advantages of *X. laevis* is that larvae at stages 50-54 (R-stage) can be recovered anatomically, histologically and functionally after a spinal cord injury (SCI). Those abilities are completely lost in juvenile frogs (NR-stage). The central canal ependymal zone of the spinal cord in larvae at R-stage presents a high percentage of neuronal progenitor cells (NPC) Sox2+. These are activated quickly in response to an injury and are necessary to achieve complete regeneration of the spinal cord. **Our interest is to identify the genetic networks and signaling pathways involved in the early activation of NPC.**

To identify the mechanisms and signaling pathways involved in the activation of Sox2+ cells, we performed a high resolution expression profiling analysis during the first 21 hours post-transection (hpt) in animals at R-stages. For this purpose, tissue from the site of the lesion was isolated every 1 hour after the lesion in transected animals, as well as in control animals, sham and uninjured. As a result of this sampling and subsequent sequencing of mRNA we obtained more than 100 RNA-seq libraries, with which an exhaustive bioinformatic analysis was carried out. The differentially expressed genes (DEGs) were identified by Gaussian processes. Subsequently, the modular structure of the DEGs was inferred using a Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA). These co-expressed modules were analyzed looking for biological processes and KEGG signaling pathways enriched. In addition, we analyzed the DNA binding motifs of transcription factor enriched in the proximal promoter of co-expressed genes and the protein-protein interactions among DEGs.

We identified 1850 GEDs that were clustered into 11 coexpression modules (3 negatively regulated, 2 positively regulated with immediate activation, 3 positively regulated with intermediate activation and 3 positively regulated with late activation). The gene ontology analysis reported: (1) an enrichment of the negative regulators of mTOR signaling in first negatively regulated module, (2) an increase in transcription factors in module of immediate activation, (3) an increase in the components of ribosome biogenesis in intermediate activation modules; and (4) an increase in genes associated to division of stem cells and cell cycle in modules of late activation.

Based on our bioinformatics analysis, we decided to study the role of mTOR pathway in the first hours after transection. Analysis by Western Blot and Immunofluorescence against p-S6, the active form of an intracellular component of the mTOR pathway, showed a rapid activation at 3 hpt and mainly in the cells of the central canal ependymal zone close to the site of the lesion and neuronal bodies in spinal cord. Inhibition of this signaling pathway using rapamycin blocks the proliferation of Sox2 + cells and functional recovery after SCI. These results suggest a key role of mTOR pathway in early activation of Sox2 + cells for suitable recovery after SCI in tadpoles.

In this way, we can conclude that we identify early changes in spinal cord transcriptome after transection which can be associated to several biological processes and signaling pathways that are deployed in sequential transcriptional waves after the SCI. Finally, bioinformatic analysis and functional tests of mTOR pathway suggest that this signaling pathway would be key during the first hours of spinal cord regeneration.

1 Introducción

1.1 Regeneración del sistema nervioso central en mamíferos

Las capacidades regenerativas varían considerablemente dentro del reino animal. Por un lado, anfibios como el ajolote o el tritón, y peces como el pez cebra son capaces de regenerar extremidades completas después de una amputación, siendo incluso capaces de regenerar otros tejidos como la médula espinal, sin embargo, otros vertebrados como aves y mamíferos son incapaces de hacerlo [Galis et al., 2003; Quiroz y Echeverri, 2013; Gemberling et al., 2013]. De esta manera la gran capacidad regenerativa de organismos vertebrados como anfibios urodelos y peces, así como también de algunos invertebrados como planarias e hidras ha llamado la atención de los científicos, principalmente debido a las limitadas capacidades regenerativas de mamíferos incluyendo a nosotros los humanos [Morgan, 1898; Sims, 1962, Alvarado y Tsonis, 2006; Chen y Poss, 2017]. Si bien los mamíferos podemos regenerar la piel, los músculos, el hígado y algunos otros tejidos, nuestra capacidad de regenerar tejidos más complejos como el sistema nervioso central (SNC) o apéndices son muy limitadas [Kyritsis et al., 2014].

Para nuestro laboratorio la regeneración del SNC es un tema de gran interés. Los mamíferos podemos regenerar los axones del sistema nervioso periférico (SNP), no así los del SNC [Blesch et al., 2012]. Sin embargo, existe un modelo de daño que nos sugiere que es posible encender cierta capacidad regenerativa en los axones del SNC. Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal poseen ramificaciones axonales tanto en el SNP como el SNC. Cuando las ramificaciones axonales del SNP son dañadas estas neuronas regeneran robustamente sus axones, lo cual ocurre de manera muy pobre al dañar las ramificaciones del SNC. Sin embargo, cuando el daño de las ramificaciones axonales del SNC es precedido por

un daño condicionante en las ramificaciones del SNP, la regeneración de los axones del SNC es mejorada de manera considerable [Liu et al., 2011; Hur y Zhou, 2012, He y Jin, 2016].

1.2 Lesiones del sistema nervioso central en mamíferos

Debido a la limitada capacidad de regeneración de nuestro SNC, un daño severo de este tejido, ya sea por enfermedades neurodegenerativas, accidentes isquémicos, cáncer o un evento traumático, podría tener consecuencia graves y permanentes en nuestra calidad de vida. El daño de la médula espinal (DME), causado principalmente por algún evento traumático el cual genera una compresión transitoria de este tejido, genera deterioros funcionales de por vida, que van desde pérdida de sensibilidad, hasta paraplejia o cuadriplejia [Maynard et al., 1997; McDonald y Sadowsky, 2002]. Estas dos últimas condiciones implican un alto costo en la calidad de vida de los afectados, ya que a la fecha no existen tratamientos efectivos que devuelvan la funcionalidad perdida. [Thuret et al., 2006]. Además, es importante destacar que mayoritariamente los afectados por este tipo de lesiones corresponden a individuos jóvenes. Según un estudio del año 2008, las lesiones en la ME tienen una incidencia anual en Chile que fluctúa entre 11,5 – 53,4 / 1.000.000 de habitantes [Lavandero et al., 2008].

Las lesiones a la ME producen daños que pueden ser divididos en dos fases:

- La primera que es iniciada por un daño primario, generalmente provocada por un evento traumático como una compresión o transección, resultando en la destrucción del tejido neural y los circuitos neurales locales [Lee-Liu et al., 2013].
- La segunda corresponde a una fase de daño secundario, resultante del proceso inflamatorio exacerbado y la formación de una cicatriz glial, la cual se convierte en

una barrera para la regeneración axonal [Lee-Liu et al., 2013; Liu et al., 2014; Gensel y Zhang, 2015].

Actualmente existen diversas investigaciones en el área de la regeneración de la ME, las cuales pueden ser divididas en tres categorías según sus blancos clínicos: rescate, reactivación y recableado de los circuitos neuronales [Ko et al., 2018; Anderson et al., 2018; Lu et al., 2012, Assinck et al., 2017]. Si bien en los últimos años se ha avanzado bastante en entender los mecanismos moleculares detrás del DME, así como en su contraparte regenerativa comprendiendo cuales serían los mecanismos que le permiten una recuperación funcional a ciertas especies, aún nos falta mucho por entender. Esto se ve reflejado en los resultados de estas investigaciones, los cuales han sido limitados para generar tratamientos clínicos que ayuden en la recuperación funcional [Ramer et al., 2014, Ruppert et al., 2019]. De esta manera, se abre la puerta a nuevos estudios y modelos que nos ayuden a seguir completando nuestro conocimiento sobre este tema.

1.3 *Xenopus laevis* y su uso como modelo de regeneración de médula espinal

La rana africana *Xenopus laevis* es un anfibio anuro de naturaleza alotetraploide que tiene un genoma de 3.1 Gbp, el cual está organizado en nueve pares de cromosomas homeólogos ($2n = 36$). Pese al amplio uso de este modelo animal en desarrollo y regeneración, su naturaleza alotetraploide dificultó el ensamblaje de su genoma, siendo finalmente publicado en la revista Nature a finales del año 2016 [Session et al., 2016]. Sin embargo, aún poseía cierto grado de fragmentación (402,501 scaffolds) en la versión 9.1 liberada durante la publicación antes mencionada. Por otra parte, también en esta publicación se identificaron 45.099 genes

que codifican para proteínas. De esta manera, la existencia de estos datos facilita enormemente el uso de técnicas de secuenciación masiva en este modelo de estudio.

Si bien *X. laevis* ha sido ampliamente utilizada como un modelo de desarrollo temprano, además tiene la característica de que sus capacidades regenerativas cambian durante su ciclo de vida, convirtiéndola también en un excelente modelo para el estudio de la regeneración de tejidos. Estas ranas tienen la capacidad de regenerar gran parte de sus tejidos, incluido el SNC durante etapas pre-metamórficas de larva o renacuajo (en el caso de *Xenopus laevis* corresponde a los estadios 50-54 que definiremos como estadios regenerativos o **estadios-R**), capacidad que se pierde durante la metamorfosis (en el caso de *Xenopus laevis* corresponde a los estadios 56-66, que definiremos como estadios no regenerativos o **estadios-NR**). Esto nos permite comparar los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de reparación de la médula espinal de un animal regenerativo (estadio-50) y de uno no-regenerativo (estadio-66) en un mismo modelo [Gaete et al., 2012; Lee-Liu et al., 2013; Edwards-Faret et al., 2017].

Nuestro laboratorio ha sido pionero en el estudio de la regeneración de la médula espinal utilizando *Xenopus* como modelo, incluso ha estableciendo una serie de metodologías y protocolos al respecto [Gaete et al., 2012; Lee-Liu et al., 2014; Muñoz et al., 2015; Tapia et al., 2017; Edwards-Faret et al., 2017; Méndez-Olivos et al., 2017; Méndez-Olivos y Larraín, 2018; Lee-Liu et al., 2018; Edwards-Faret et al., 2018].

Estos trabajos previos han demostrado que luego de una lesión a la ME ocurre una activación y proliferación de progenitores neurales (NPC) que expresan el gen *sox2* y que están presentes en la zona endimaria de la médula espinal de animales en estadio-R [Gaete et al., 2012; Muñoz et al., 2015; Edwards-Faret et al., 2018]. Experimentos de *knock-down* utilizando morfolinós y un dominante negativo para Sox2, demuestran claramente que la

regeneración de la médula espinal y consecuente recuperación de la capacidad de nado es dependiente de la expresión del factor de transcripción Sox2 y de la activación de la proliferación de NPC [Muñoz et al., 2015].

Por otra parte, experimentos de análisis de expresión global utilizando RNA-seq para comparar la expresión génica de los estadios -R y -NR de *X. laevis* a 1, 2 y 6 días después de un DME demostraron una expresión génica diferencial entre los estadios R y NR [Lee-Liu et al., 2014]. Se encontraron 2.199 genes expresados diferencialmente sólo en el estadio-R, otros 3.827 genes solo el en estadio-NR, mientras 1405 genes lo fueron en ambos estadios (R y NR). Además, se observó que los cambios en el transcriptoma tuvieron una temporalidad distinta al comparar ambos estadios, mientras el estadio-R mostró una respuesta más rápida, con una mayor cantidad de genes diferencialmente expresados al día 1 (2.214 genes), en el estadio-NR el mayor cambio en el transcriptoma se observó al día 6 (4.317 genes). Análisis de ontología génica dieron como resultado un enriquecimiento en genes asociados a ciclo celular y procesos metabólicos a los días 1 y 2 en animales estadio-R, lo cual no fue observado en animales estadio-NR. Este aumento en genes de ciclo celular podría ser correlacionado con el aumento en la proliferación de progenitores neurales Sox2+ que se observó en esta ventana de tiempo durante la regeneración de la médula espinal en animales estadio-R [Muñoz et al., 2015]. Si bien estos análisis transcriptómicos fueron hechos en tejido completo y no en células purificadas, debido al alto contenido de NPC en la médula espinal de animales estadio-R, se puede inferir que gran parte de los cambios observados en el transcriptoma durante este estudio ocurrirían en dicha población celular. De dicho trabajo llamó la atención que no se identificaron vías de señalización que pudiese ser responsables de la activación de la respuesta regenerativa.

De esta manera, debido a los rápidos cambios observados en el transcriptoma de animales en estadios-R y especialmente al aumento de los niveles de mRNA asociados a ciclo celular en respuesta al daño en la médula espinal, nos hemos formulado interrogantes como: **¿Qué cambios están ocurriendo a nivel global en el transcriptoma de la médula espinal de animales en estadio-R durante el primer día después del daño? ¿Qué genes o vías de señalización están encendiendo este programa regenerativo y en particular la proliferación de células Sox2+?**

1.4 Mecanismos de señalización temprana en respuesta a daño

Se ha propuesto que la respuesta temprana al daño correspondería a un mecanismo conservado de señalización, el cual es desplegado inmediatamente después de una lesión. Esta respuesta ha sido dividida en dos etapas, una primera independiente- y otra segunda dependiente- de transcripción (**Fig. 1**) [Cordeiro y Jacinto, 2013].

La respuesta temprana independiente de transcripción es activada inmediatamente después de ocurrido un daño, siendo necesaria para censar que ha ocurrido una lesión e informar de esto a los tejidos sanos. Temporalmente es activada segundos a minutos después del evento de daño, mientras la maquinaria de expresión génica está siendo redirigida para responder al desafío impuesto por la herida. Esta respuesta ha sido ampliamente estudiada en el modelo de reepitelialización, donde se ha observado que es mediada por señales de daño difusibles como Ca^{2+} , especies reactivas de oxígeno (ROS) y moléculas purinérgicas, todas independientes de transcripción. [Cordeiro y Jacinto, 2013].

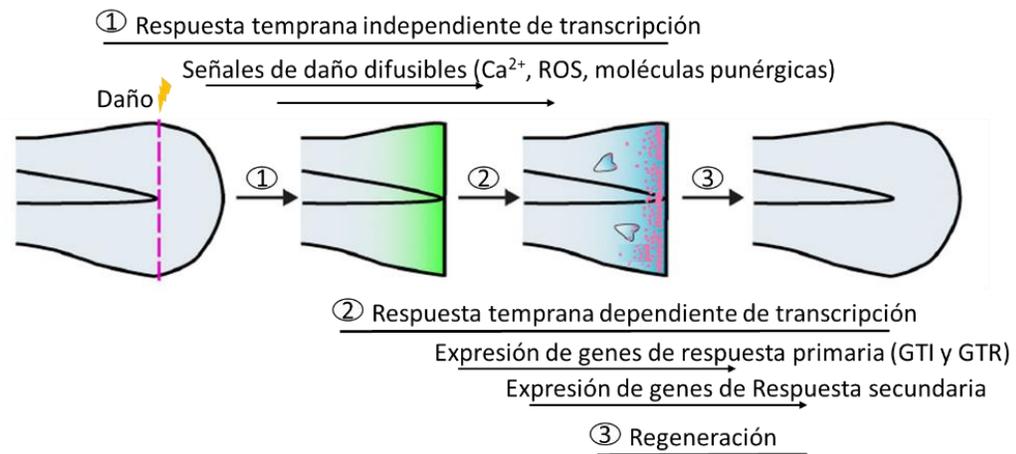


Figura 1. Esquema de señalización temprana en respuesta a daño. Etapas de la respuesta temprana luego del daño, en verde se representan las señales de daño difusibles, mientras los puntos rosados representan los eventos transcripcionales. GTI = Genes Temprano-Inmediatos, GTR = Genes Temprano-Retrasados. Adaptado de Yoo et al., 2012.

Estudios en regeneración de cola en ajolote, pez cebra y *Xenopus* han demostrado que un bloqueo en las señales inmediatas de ROS y Ca^{2+} mediante inhibidores farmacológicos son capaces de frenar el proceso regenerativo. Incluso se ha visto que estas señales generan un gradiente desde la zona del daño a regiones más alejadas, que en el modelo de amputación de aleta en pez cebra pueden llegar a los 200 nm [Al Haj Baddar et al., 2019, Yoo et al., 2012; Love et al., 2013; Tu y Borodinsky, 2014].

La respuesta temprana dependiente de transcripción es iniciada minutos a horas después de la lesión y comienza con la inducción transcripcional de los denominados **Genes de Respuesta Primaria (GRP)**. Estos se caracterizan porque su transcripción no necesita síntesis de nuevas proteínas, ya que es mediada por la maquinaria transcripcional pre-existent. Los GRP son los encargados de inducir la expresión de los **Genes de Respuesta Secundaria (GRS)**, quienes finalmente generarán un cambio en el fenotipo celular, induciendo una respuesta efectiva frente al estímulo. La expresión de los GRS es posterior a la de los GRP, ya que requiere la síntesis de nuevas proteínas, a partir de los ARNm de factores de transcripción (FT) que se expresan durante la respuesta primaria [Fowler et al., 2011].

Los GRP han sido clasificados en dos categorías, **Genes Temprano-Inmediatos (GTI)** y **Genes Temprano-Retrasados (GTR)**, según su cinética de expresión [Avraham y Yarden, 2011; Tullai et al., 2007]. En el modelo de estimulación del Receptor de EGF, un modelo ampliamente utilizado para la investigación de la respuesta temprana dependiente de transcripción, los GTI son expresados de manera rápida y transitoria en un primer pulso transcripcional, y hasta aproximadamente 45 min después de la estimulación son los únicos genes activados. Los GTI son regulados tanto a nivel transcripcional como traduccional y codifican en su mayoría para factores de transcripción, entre los que se encuentran c-FOS, c-

JUN, c-MYC [Healy et al., 2013]. Por otra parte, los GTR comienzan a ser expresados entre 45-120 min después de la estimulación en un segundo pulso transcripcional, en este grupo son incluidos genes como DKK1, SDC4, SOD2, entre otros [Avraham y Yarden, 2011; Tullai et al., 2007].

La respuesta temprana dependiente de transcripción está involucrada en una gran variedad de procesos biológicos, entre lo que se incluyen proliferación, diferenciación, metabolismo. Típicamente es inducida luego de una señal extracelular, tal como factores de crecimiento, señales inmunológicas, de estrés y de daño [Healy et al., 2013]. Gran parte de lo que se ha investigado sobre la respuesta temprana dependiente de transcripción, como la identificación de GRP, sus temporalidades y mecanismos regulatorios, no ha sido hecho en modelos de daño, sino en modelos de estimulación por factores de crecimiento como EGF y PDGF [Avraham y Yarden, 2011; Tullai et al., 2007]. Sin embargo, hay algunos estudios que han intentado describir la respuesta temprana dependiente de transcripción luego de un daño, entre ellos existen algunos que lo han hecho frente a un daño a la médula espinal en modelo murino (no regenerativo) [Hayashi et al., 2000; Carmel et al., 2001; Song et al., 2001; Di Giovanni et al., 2003; Rice et al., 2007]. En uno de estos estudios, se evaluó la inducción de genes durante las primeras horas luego de una lesión a la médula espinal utilizando un análisis de GeneChip con 1263 genes. 3 horas después de la lesión encontraron 76 genes expresados diferencialmente, 32 aumentados y 44 disminuidos. Entre estos, observaron un aumento en la expresión de genes como c-FOS y CCNL1 (Ciclina L1) (ambos GTI), SOCS3 (gen relacionado a respuesta inflamatoria) y HSP70, entre otros [Song et al., 2001]. Otro de estos trabajos, identificó un rápido aumento de GTIs a los 30 minutos luego de un DME y una respuesta secundaria entre 4 – 24 horas enriquecida en genes asociados a inflamación, estrés oxidativo, daño al ADN y

ciclo celular [Di Giovanni et al., 2003]. Sin embargo, ninguno de estos estudios posee una resolución y profundidad óptima para analizar el transcriptoma a un nivel global.

Por otra parte, a la fecha no existen estudios que analicen la respuesta temprana dependiente de transcripción desplegada por un modelo regenerativo luego de un daño a la médula espinal, por lo menos no utilizando un nivel de resolución y profundidad adecuado, el cual permita reconstruir de manera global los eventos que se están encendiendo y apagando durante las primeras etapas de la regeneración de la médula espinal.

1.5 Estudio de los cambios tempranos del transcriptoma en modelos regenerativos

Los cambios tempranos del transcriptoma han comenzado a cobrar interés en el estudio de la regeneración, específicamente por la búsqueda y caracterización de programas transcripcionales que sean capaces de iniciar un proceso de reparación eficiente. Además, el perfeccionamiento en las técnicas secuenciación masiva ocurrido en el último tiempo [Schena et al., 1995; Valouev et al., 2008, Wang et al., 2009, Hashimshony et al., 2012; Buenrostro et al., 2015], ha facilitado el avance en el estudio de los cambios tempranos del transcriptoma en diversos modelos regenerativos, tanto vertebrados como invertebrados [Wenemoser et al., 2012; Stewart et al., 2013].

Un trabajo muy interesante es el del laboratorio de Peter Reddien que estudió cambios tempranos en los niveles de ARNm durante la regeneración de la planaria utilizando microarreglos. Para esto analizaron las primeras 12 horas después del daño. En su estudio identificaron la presencia de dos oleadas transcripcionales: la primera comienza a los 30 minutos (W1) y la segunda se inicia a partir de las 3 horas (W2). W1 está compuesta por homólogos de GTI, como FOS, JUN, EGRL-1, entre otros. W2 está compuesta por genes que

codifican para factores secretados (proteínas de señalización y factores remodeladores de la matriz extracelular), como WNT1, NGL-1, ADAM-2, los cuales corresponderían a GRS. Mediante el uso de ARNsi para FOS-1 (homólogo de FOS) demostraron la importancia de los genes expresados tempranamente, puesto que el bloqueo de su expresión resulta en una alteración del proceso regenerativo, dando como resultado planarias cíclopes y de blastemas más pequeños [Wenemoser et al., 2012].

Otro modelo regenerativo en el cual se han analizado los cambios tempranos del transcriptoma es la regeneración de la extremidad anterior de salamandra, los cuales fue estudiada utilizando RNA-seq. Durante las primeras 24 horas observaron un aumento en la expresión de oncogenes descritos previamente como GTI, entre estos FOS, JUN, ATF3, EGR1. También se observó un aumento en la expresión de metaloproteinasas de matriz, como MMP3, MMP13, ambas descritos previamente como GRS, y fosfatasas de especificidad dual, como DUSP1, DUSP7 y DUSP5, la cual también ha sido descrita previamente como un GTI [Stewart et al., 2013]. Estas últimas proteínas están envueltas en la señalización de la vía MAPK/ERK, cuya importancia ha sido comprobada en el inicio de la regeneración en hidra [DuBuc et al., 2014].

Respecto a estudios de expresión temprana en *Xenopus*, Love et al. (2011) hicieron ensayos de microarreglos en regeneración de cola en *Xenopus tropicalis* en estadios 49-51. En estos ensayos identificaron una sobrerrepresentación de genes involucrados en respuesta inmune durante las primeras 6 horas, mientras que entre las 6 – 24 horas observaron un aumento en la expresión de genes relacionados a ciclo celular y replicación del ADN. Sin embargo, debido a que este estudio comienza evaluando los cambios transcripcionales a las 6 horas, no fue posible identificar grupos de GTIs o GTRs presentes en esta respuesta de daño.

De esta manera, el uso de técnicas de secuenciación masiva ha ido tomando gran fuerza en la última década, y gracias al nivel de profundidad que permite llegar hace posible analizar los cambios del transcriptoma de una manera más completa, y así poder reconstruir de una forma más fidedigna el proceso estudiado.

1.6 Bioinformática y secuenciación masiva: combinando herramientas para responder grandes preguntas

Debido a la gran cantidad de datos que generan las técnicas de secuenciación masiva, se ha hecho cada vez más importante el desarrollo y aplicación de nuevas herramientas que permitan el análisis exhaustivo de esta información. Existen algunas investigaciones que combinando estas herramientas han ayudado a mejorar nuestro conocimiento acerca de procesos tan complejos como: regeneración del sistema nervioso, activación de progenitores neurales y la activación transcripcional que ocurren desde la fertilización hasta las primeras etapas del desarrollo en *Xenopus*.

En 2016, Chandran et al. realizaron un estudio a nivel de sistemas utilizando como base un análisis de redes de co-expresión ponderada (WGCNA, Weighted Gene Co-expression Network Analysis). Este análisis tenía como objetivo identificar la red asociada a la regeneración de axones periféricos luego de una lesión. Para esto, analizaron la estructura modular de los cambios del transcriptoma en las neuronas de la raíz del ganglio dorsal luego de un daño en proyecciones axonales periféricas, para varios conjuntos de datos, posteriormente mediante un análisis de redes de consenso identificaron 5 módulos de co-expresión conservados entre las redes y además asociados a regeneración. Luego de someter estos módulos a diversos análisis bioinformáticos, seleccionaron los 280 genes más

interconectados en una red de interacción proteína – proteína, y compararon sus perfiles de expresión contra una base de datos de perfiles de expresión asociados a drogas. Como resultado identificaron a ambroxol como una droga que generaba un patrón de expresión génica similar. Cuando probaron esta droga en regeneración axonal de células ganglionares de la retina, pudieron comprobar que la regeneración axonal era significativamente mayor al vehículo [Chandran et al., 2016].

Por otra parte, el laboratorio de Martin-Villalba se ha dedicado al estudio de las diferentes poblaciones de células troncales neurales presentes en el cerebro de murinos, poniendo énfasis en comprender su proceso de activación y posterior diferenciación [Llorens-Bobadilla et al., 2015; Kalamakis et al., 2019; Baser et al., 2019]. Para esto han combinado el uso de técnicas de secuenciación masiva de ARN en células únicas y sofisticados análisis bioinformáticos. En sus investigaciones, han logrado modelar los cambios transcripciones que sufre en el tiempo una célula troncal neural al pasar de un estado de quiescencia a un estado activado, identificando en esta transición 4 diferentes poblaciones celulares: qNSC1 (células troncales neurales quiescentes 1), qNSC2 (células troncales neurales quiescentes 2), aNSC1 (células troncales neurales activadas 1) y aNSC2 (células troncales neurales activadas 2). Ellos observaron que durante la activación de las células troncales neurales se observa una disminución en la expresión de genes asociados a glicólisis y marcadores gliales y un aumento en la expresión de genes asociados a ribosomas, lo cual se ve reflejado en un aumento gradual en la síntesis de proteínas ($qNSC1 < qNSC2 < aNSC1/2$). Como esperaríamos, las poblaciones activadas (aNSC1 y aNSC2) muestran una mayor expresión de genes asociados a ciclo celular y la población aNSC2 a su vez también presenta un aumento en la expresión de genes asociados a mitosis [Llorens-Bobadilla et al., 2015].

En 2014, Collart et al., utilizaron la técnica de perfiles de alta resolución temporal para estudiar el proceso de activación génica durante la etapa de transición midblastula (MBT). Esta técnica consistió en realizar secuenciación de ARN en series de tiempo, para posteriormente mediante herramientas bioinformáticas reconstruir los perfiles de expresión de cada gen y poder estimar en que momento de la ventana de estudio se producía su activación. Ellos observan que durante la fertilización y la primera gastrulación se produce la activación de tres diferentes oleadas transcripcionales. Posteriormente, en 2016 este mismo equipo de investigación utiliza una metodología similar para estudiar la cinética del transcriptoma durante las primeras 66 horas del desarrollo de *Xenopus tropicalis*, analizando los cambios transcripcionales desde la fertilización hasta el estadio 42 [Owens et al., 2016].

Estos antecedentes nos demuestran el impacto que puede llegar a tener, en diferentes campos de investigación, el combinar dos poderosas herramientas como lo son las técnicas de secuenciación masiva y la bioinformática.

En resumen, nuestras limitadas capacidades regenerativas siempre han despertado la curiosidad de los científicos por entender como otras especies son capaces de recuperar partes anatómicas dañadas, tanto de una manera física como funcional. En base a esto pensamos que el estudio del transcriptoma temprano en modelos regenerativos nos puede ayudar a identificar genes o vías de señalización que sean claves para encender estos procesos en modelos no regenerativos. Por otra parte, debido a la complejidad de estos procesos, uno de los grandes desafíos es saber cómo explorarlos, en esta parte pensamos que el uso de técnicas de secuenciación masiva acompañado de exhaustivos análisis bioinformáticos podrían ser clave

para hacerlo. Finalmente, contextualizándonos en nuestro modelo de estudio nos hemos planteado algunas interrogantes como:

¿Existe un cambio específico y temprano del transcriptoma de la médula espinal luego de ser dañada en *Xenopus laevis*? ¿Es este cambio en el transcriptoma el responsable de encender un programa regenerativo?

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar genes o vía de señalización tempranos y necesarios para la regeneración de la médula espinal de *Xenopus laevis*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar los cambios globales del transcriptoma desplegados en la médula espinal durante las primeras 21 horas posteriores al daño.
2. Realizar análisis bioinformáticos para identificar posibles genes o vías de señalización involucrados en la regeneración de la médula espinal y validar sus cambios mediante técnicas de biología molecular.
3. Determinar la función de genes y/o vías de señalización en el proceso de regeneración de la médula espinal.

3 Materiales y Metodologías

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos e insumos generales

Acrilamida/Bisacrilamida, BioRad Cat# 1610158

Ampicilina, USBiological Cat# A2260

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃), Winkler Cat# 144558

Cloruro de Calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O), Winkler Cat# CA-0520

Cloruro de Potasio (KCl), Winkler Cat# 7447407

Cloruro de Sodio (NaCl), Merck Cat# 7647145

Deoxicolato de Sodio, Sigma D6750-25G

Dodecilsulfato Sódico (SDS), USBiological Cat# C10102881

Estándar de peso molecular de proteínas, ThermoFisher Scientific Cat# 26619

Estreptomina, Sigma-Aldrich Cat# S1277-50G

Fosfato Disódico heptahidratado (Na₂HPO₄·7H₂O), Winkler Cat# BM-1675

Fosfato Monopotásico (KH₂PO₄), Merck Cat# 1048731000

Glicina, USBiological Cat# C16122865

HEPES, ThermoFisher Scientific Cat#11344041

MS-222, Fluka Cat# A5040-250G

Nitrato de Calcio tetrahidratado (Ca(NO₃)₂·4H₂O), Winkler Cat# CA-0535

NP-40, Winkler Cat# BM1225

Sulfato de Magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O), Merck Cat# 10034998

Tris base, Merck Cat# 77861

Triton X-100, USBiological Cat# T8655

Tween-20, Sigma Cat# 9005645

3.1.2 Soluciones y Amortiguadores

Barth 10X: NaCl 889 mM; KCl 10 mM; NaHCO₃ 24 mM; HEPES 100 mM; MgSO₄·7H₂O 8 mM; Ca(NO₃)₂·4H₂O 3,3 mM, CaCl₂·2H₂O 4,1 mM; ajustado a pH 7,6

Amortiguador fosfato salino (PBS) 10X: NaCl 1,37 M; KCl 27 mM; Na₂HPO₄ 101 mM; KH₂PO₄ 18 mM; ajustado a pH 7,4

Amortiguador RIPA: Tris base 25mM; NaCl 150 mM; NP-40 1%; Deoxicolato de Sodio 1%; SDS 0.1%

Amortiguador de electroforesis 1X: Tris base 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0.1%

Amortiguador de transferencia 1X: Tris base 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0.1%; Metanol 20%

Amortiguador Tris Salino – Tween 20 (TBST) 10X: Tris base 200 mM; NaCl 1.37 M; Tween-20 1%

3.2 Metodologías

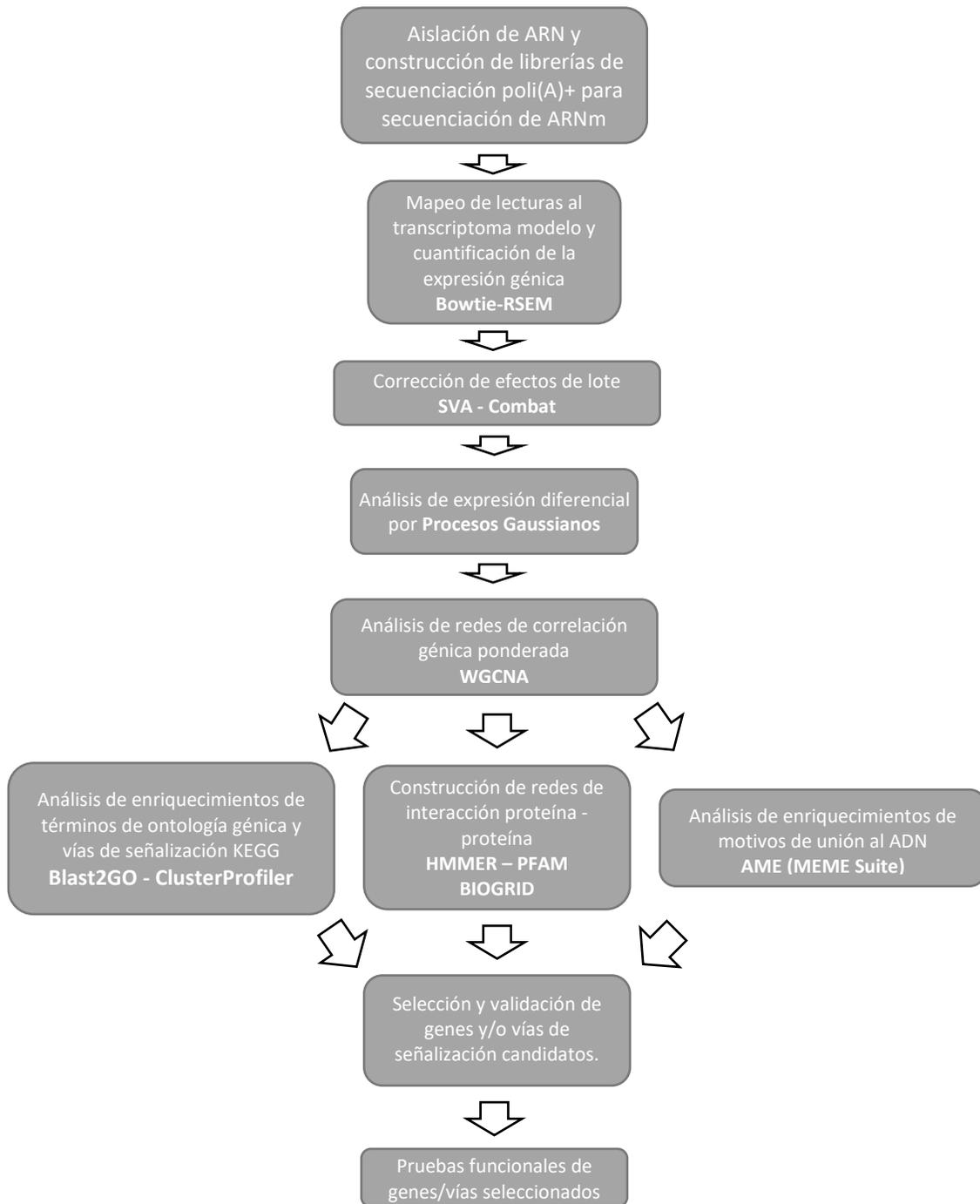


Figura 2. Flujograma de trabajo. Se ilustran las etapas de nuestro trabajo y el orden cronológicos según fueron llevadas a cabo.

3.2.1 Manejo de animales

Los renacuajos de *Xenopus laevis* son generados mediante fertilización natural. Con este objetivo macho y hembra son pre-inyectados con 50 UI de gonadotrofina coriónica humana (GCH) 72 horas previas al *amplexus* y posteriormente estos vuelven a ser inyectados con 300 UI de GCH para el macho y 700 UI para la hembra momentos antes de aparearlos para la fertilización. Macho y hembra son reunidos en una caja con solución Barth 0.1X sin antibiótico y dejados toda la noche en incubador a 18°C. A la mañana del día siguiente los huevos son recolectados en placas de petri con una solución de Barth 0.1X y posteriormente tratados con cisteína para remover la capa de gelatina (*jelly coat*) que envuelve a los huevos, con el objetivo de evitar que estos se adhieran entre sí de forma de facilitar su manipulación. Durante el primer día los huevos fertilizados se limpian en reiteradas ocasiones retirando aquellos huevos no fertilizados o en mal estado. En los días posteriores la solución Barth 0.1X es cambiada diariamente y son retirados aquellos embriones con problemas en el desarrollo. Su desarrollo se continúa en placas de petri hasta el estadio 44 y luego son pasados a cajas plásticas con agua libre de cloro y mantenidos a 22°C durante el resto del desarrollo. Desde el estadio 44 los animales son alimentados diariamente con comida para *Xenopus* en polvo comprada en Nasco (Cat# SB09480) y el agua es cambiada tres veces por semana [Edwards-Faret et al., 2017].

Para la totalidad de nuestros experimentos se utilizaron animales en estadios 49-51 (Estadio regenerativo). Estos animales fueron seleccionados bajo lupa de acuerdo a las características morfológicas descritas por Nieuwkoop y Faber (1994) para estos estadios, específicamente chequeando la aparición y tamaño de los muñones de las extremidades posteriores (**Fig. 3**).

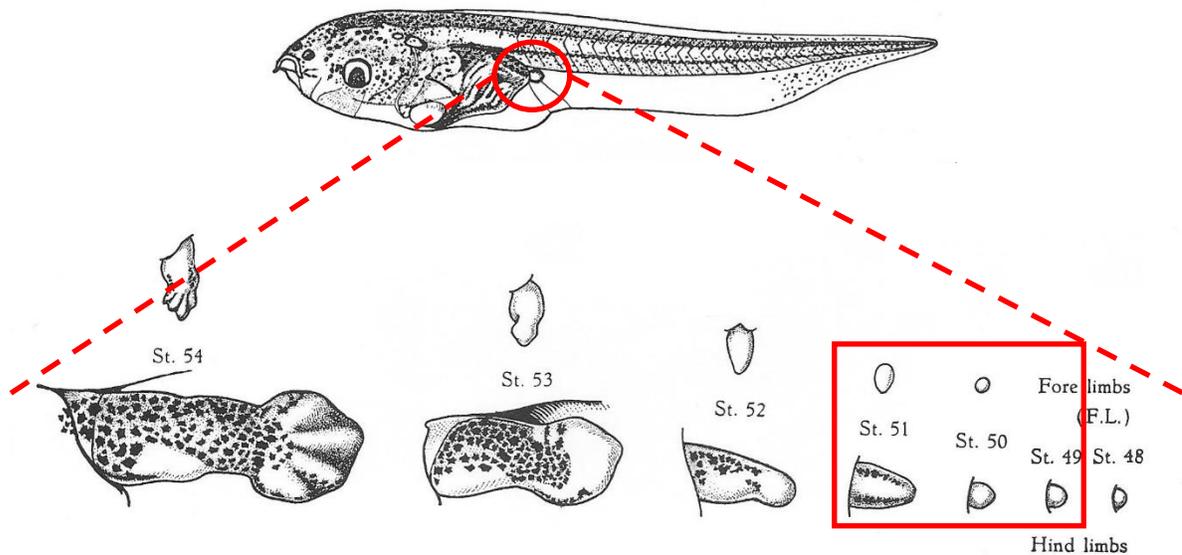


Figura 3. Características morfológicas de animales en estadios-R. En la parte superior de la figura se observa un animal estadio 50 y su extremidad posterior, utilizada en la selección de estadios, es destacada con un círculo rojo. En la parte posterior se observa como cambia esta extremidad durante el desarrollo entre los estadios 48 – 54. En un cuadrado rojo se destacan las características morfológicas de la extremidad posterior en los estadios 49 – 51, los cuales fueron utilizados en este estudio (Adaptado de Nieuwkoop y Faber, 1994).

3.2.2 Condiciones experimentales y procedimientos quirúrgicos

Tres condiciones experimentales fueron utilizadas durante este trabajo. Animales con una transección completa de médula espinal y dos condiciones controles, animales con daño simulado (*sham*), en que sólo se daña la piel y el músculo sin afectar la médula espinal, y animales sin daño. Los animales *sham* fueron utilizados para filtrar aquellos cambios transcripcionales desplegados en la médula espinal por un daño en zonas cercanas a la médula espinal, como piel y músculo. Por otra parte los animales sin daño fueron utilizados para descartar cambios transcripcionales generados por el avance en el desarrollo durante nuestra ventana de observación.

El día anterior a inducir los distintos tipos de daño, los animales son seleccionados bajo lupa y posteriormente dejados en una solución de Barth 0.1X conteniendo antibióticos (0.06 mg/mL de Penicilina y 0.1 mg/mL de Estreptomina) hasta comenzar las intervenciones. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron de acuerdo con lo descrito previamente por nuestro laboratorio [Edwards-Faret et al., 2017]. Brevemente, previo a cualquier procedimiento los animales son anestesiados en una solución de Barth 0.1X conteniendo MS222 0.05% durante aproximadamente 2 minutos. Posterior a esto se procede a las cirugías: la transección corresponde al corte con tijera quirúrgica de piel, músculo y médula espinal a nivel torácico medio, generando así una completa disrupción de los tractos axonales, mientras que la cirugía *sham* corresponde solo al daño de la piel y el músculo al mismo nivel torácico. En el caso de los animales sin daño estos sólo fueron sometidos a la etapa de anestesia. Finalmente, luego del procedimiento quirúrgico los animales fueron dejados nuevamente en solución Barth 0.1X + antibiótico durante el resto del tiempo de experimentación.

3.2.3 Perfiles de alta resolución temporal

3.2.3.1 Muestreo

Se realizó un muestreo en series de tiempo durante las 21 horas siguientes al daño de la médula espinal, utilizando como controles animales en condiciones *sham* y sin daño. Las condiciones **transectado y sham** fueron muestreadas en paralelo utilizando animales provenientes de una misma camada. Para estas condiciones, la ventana de observación (21 horas) fue cubierta mediante seis series de tiempo con 1 ó 2 puntos de solapamiento para así facilitar la unión de los datos en las etapas de análisis bioinformáticos. Las series de tiempo S1 y S2 fueron un replicado biológico, preparadas con animales de una misma camada y muestreadas con 3 días de diferencia. Éstas abarcaron de 0 – 2 horas, utilizando intervalos de muestreo de 30 minutos. Las series S3, S4, S5 y S6 fueron muestreadas a intervalos de una hora y abarcan 1 – 6h, 6 – 12h, 10 – 18h y 16 – 21h respectivamente, incluyendo adicionalmente todas un punto 0h. El detalle de cada serie y sus puntos de solapamiento es indicado en la **Fig. 4**.

Los animales **sin daño** fueron muestreados de manera independiente, utilizando dos series de tiempo (S7 y S8) para cubrir la ventana de observación y utilizando intervalos de muestreo de 60 minutos. Ambas series tienen de 2 puntos de solapamiento (**Fig. 4**).

Para las series S1 y S2, las cuales correspondieron a nuestros ensayos piloto, cada punto de muestreo consistió del material biológico de 10 secciones caudales de médula espinal, mientras los puntos de muestreo de las series S3-8 fueron preparados aislando 12 secciones caudales de médula espinal.

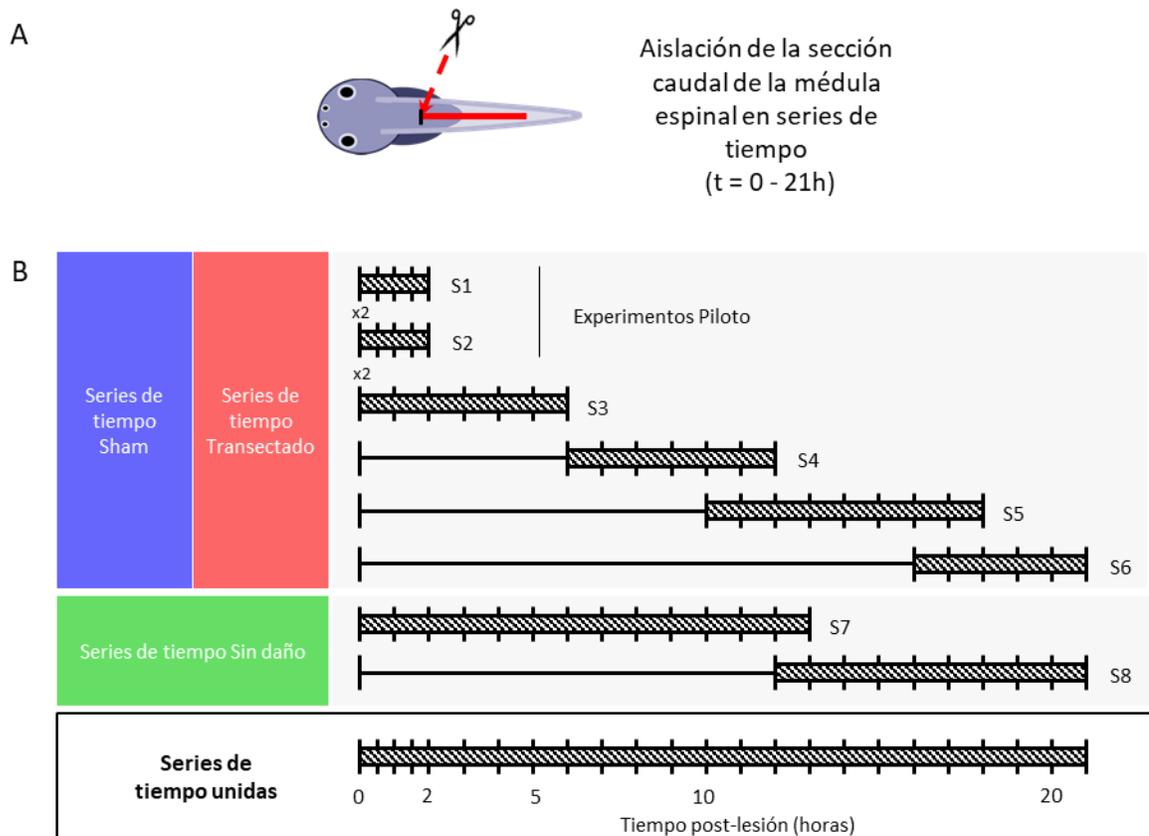


Figura 4. Detalles del muestreo de animales. En A observamos el diagrama de un animal estadio 50, indicando la zona donde se realiza la lesión y la sección de la médula espinal que es aislada para la posterior extracción de ARN. En B observamos las 8 series que componen el estudio transcriptómico temprano de los niveles de ARNm luego de daño en la médula espinal para las condiciones sham, transectado y sin daño. Se observan los tiempos que abarca cada serie, así como también los puntos de solapamiento entre series.

3.2.3.2 Sincronización del muestreo

Condiciones transectado y *sham*: para obtener un muestreo sincronizado, lo cual es determinante para obtener resultados consistentes, se procesaron inicialmente 5 ó 6 grupos de animales de cada condición, para muestreos de 10 y 12 animales por cada punto. Los grupos fueron sometidos a las intervenciones quirúrgicas respectivas cada 5 minutos, intercalando condiciones transectado y *sham* hasta completar la totalidad de ellos. El número de animales incluido en cada grupo correspondía a dos renacuajos por cada punto de muestreo en la serie de tiempo, excepto en el grupo final de la condición transectado en la cual se incluyeron 2 adicionales para reemplazar posibles muertes durante el proceso de muestreo. Una vez cumplido el tiempo de muestreo se procedió a aislar la sección caudal de dos animales de cada grupo hasta completar el número requerido (**Fig. 5**).

Sin daño: para obtener un muestreo sincronizado se procesaron inicialmente 6 grupos de animales, los cuales fueron anestesiados cada 5 minutos y posteriormente dejados en Barth 0.1X + antibiótico. El número de animales incluido en cada grupo correspondía a dos renacuajos por cada punto de muestreo en la serie de tiempo. Una vez cumplido el tiempo de muestreo se procedió a aislar la sección caudal de dos animales de cada grupo hasta completar el número requerido.

Inmediatamente después de aisladas las médulas espinales fueron colocadas en RNAlater (Cat# 76104), para estabilizar y proteger la integridad del ARN.

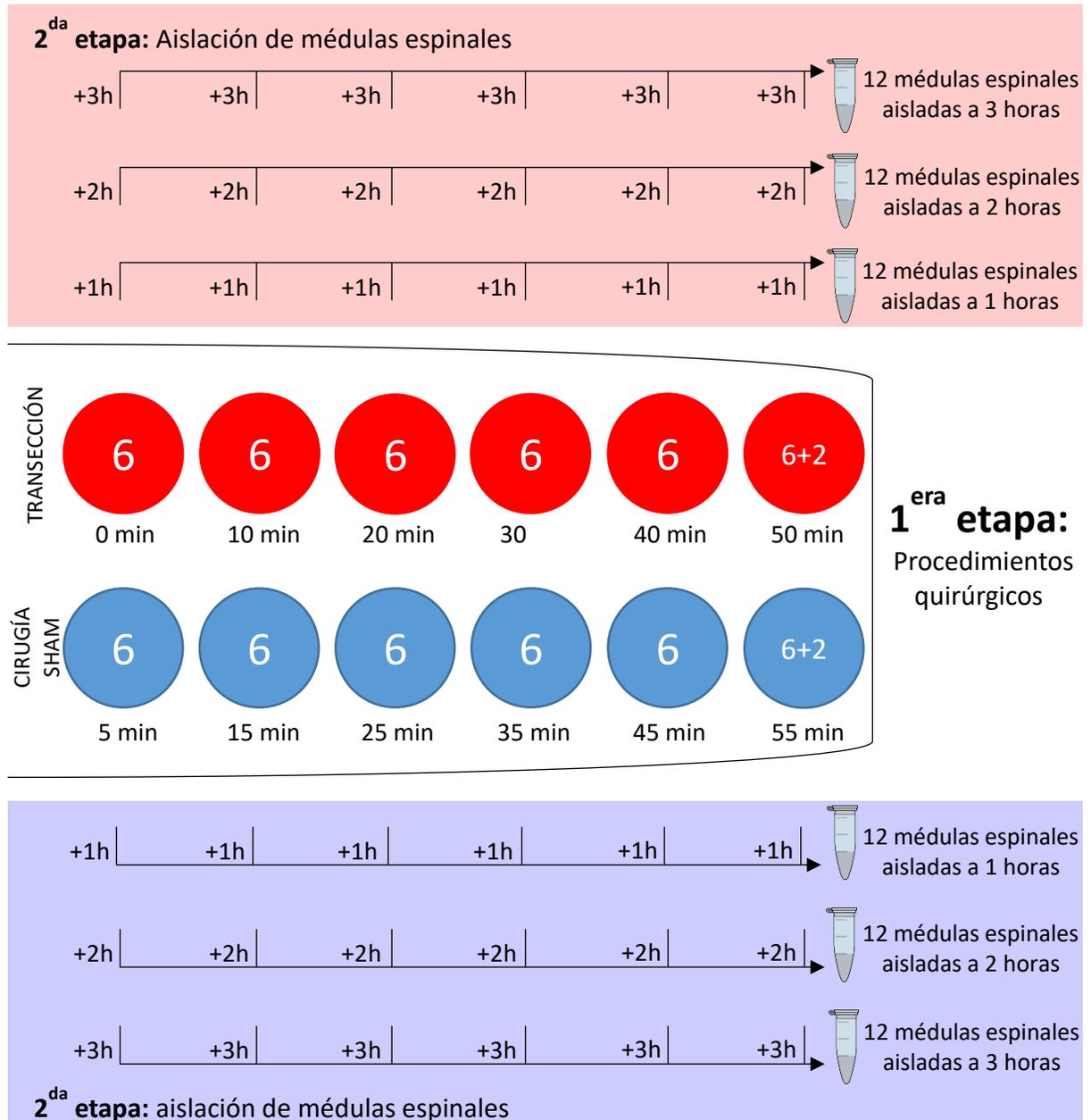


Figura 5. Esquematización del muestreo de una serie de tiempo 1-3 horas para las condiciones transectado y sham en paralelo. En una primera etapa se realizan los respectivos procedimientos quirúrgicos 12 grupos de animales, 6 para la condición transectado y 6 para la condición *sham*. Estos grupos son procesados cada 5 minutos, alternando los grupos de cada condición. Cada uno de los grupos está compuesto de 6 animales, debido a que se realizara el muestreo 2 medulas espinal por cada punto temporal, en este caso 3 (1, 2 y 3 horas). Los grupos operados a los 50 y 55 minutos poseen 2 animales adicionales para corregir posibles errores en los muestreos de tiempos anteriores. Una vez cumplido el tiempo de muestreo para cada grupo se procede a aislar 2 médulas espinales, las cuales son puestas en RNAlater y al finalizar el muestreo habrá 12 médulas espinales para cada punto temporal en cada condición.

3.2.3.3 Preparación de librerías

Una vez finalizado el muestreo de cada serie se procedió a realizar las extracciones de ARN utilizando el RNeasy Minikit de Qiagen (Cat# 74104). En este proceso se incluyó una etapa de tratamiento con DNAsa (Cat# 79254) para eliminar posibles contaminaciones con ADN. El rendimiento y la pureza de las extracciones de ARN fueron cuantificados utilizando los equipos Nanodrop o Epoch según estuviesen disponibles. El detalle de los valores obtenidos en las distintas librerías se describe en el Apéndice 1.

Previo a la preparación de las librerías se midió la integridad del ARN (Numero de integridad del ARN, RIN) utilizando el equipo Bioanalyzer 2100. Las librerías de secuenciación de ARN mensajeros fueron construidas con el kit TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 de Illumina (Cat# RS-122-2001). Debido a diferencias en los rendimientos de las extracciones de ARN el material de partida no fue siempre el mismo para la preparación de todas las librerías, sin embargo, el material de partida para los puntos temporales de una misma serie siempre fue constante (ver **Tabla 1**). Las librerías fueron preparadas según las indicaciones del Illumina proporcionadas en el manual del kit. De forma resumida la preparación de las librerías consiste en una primera etapa de purificación de ARNm utilizando esferas magnéticas unidas a oligo-dT, seguido de la fragmentación de los mensajeros. En las siguientes etapas se procede a sintetizar la primera y segunda hebra del ADNc, seguido por la formación de extremos romos, necesarios para las siguientes fases, utilizando un mix con actividad exonucleasa 3'-5' y actividad polimerasa 5'-3'. A continuación, se procede a adenilar los extremos 3', paso necesario para la posterior ligación de adaptadores. Luego, las librerías son amplificadas por PCR y su calidad es chequeada utilizando el equipo Bioanalyzer

2100, lo cual permite medir la distribución de tamaños de los fragmentos que la componen. En el Apéndice 2 se muestran dos electroferogramas representativos de la calidad de nuestras preparaciones. Las librerías fueron secuenciadas utilizando la plataforma Illumina HiSeq-2000 obteniendo lecturas pareadas de 50-51 pb. Es importante destacar que la medición de RIN, preparación de librerías y secuenciación fueron realizadas por nuestros colaboradores en el Francis Crick Institute.

Tabla 1. Detalles de preparación de librerías Illumina para secuenciación masiva

Serie	Tiempos	dT	ARN total (ng)	Vol. Total (µL)
S1	0 – 2 horas	0,5h	120	50
S2	0 – 2 horas	0,5h	200	50
S3	0 – 6 horas	1h	500	50
S4	0, 6 – 12 horas	1h	500	50
S5	0, 10 – 18 horas	1h	350	50
S6	0, 16 – 21 horas	1h	400	50
S7	0 – 13 horas	1h	400	50
S8	0, 12 – 21 horas	1h	400	50

3.2.4 Procesamiento bioinformático de las secuenciones

3.2.4.1 Determinación de calidad de secuencias

La calidad de las librerías secuenciadas se analizó utilizando la herramienta bioinformática FASTQC [Andrews, 2010]. Como parámetros de calidad consideramos: valor de calidad de secuenciación promedio de lecturas, valor de calidad de secuenciación promedio por base y contenido de bases N. Los resultados obtenidos son resumidos en el Apéndice 1, donde además se informa el porcentaje de lecturas con una calidad promedio Q20 y Q30, lo cual corresponde a una exactitud del 99% y 99,9%, respectivamente, en el nucleótido asignado

durante la secuenciación. En las siguientes secciones estos resultados serán discutidos en mayor detalle.

3.2.4.2 Determinación de abundancia de transcritos

Para determinar la abundancia de transcritos, las librerías fueron mapeadas al transcriptoma modelo v9.1 de *Xenopus laevis* obtenida desde Xenbase. Este transcriptoma está compuesto por 45.099 transcritos primarios. Para realizar el mapeo se utilizó en conjunto las herramientas bioinformáticas Bowtie-RSEM [Langmead et al., 2009; Li et al., 2011], utilizando parámetros por defecto. En resumen, se permitió un máximo de 2 bases mal apareadas (-n 2) en la secuencia semilla, a la cual se le asignó una longitud de 25 bases (-l 25, valor por defecto en RSEM) y se permitió un tamaño de inserto entre las lecturas pareadas entre 1-1000 (-I 1 -X 1000, ambos valores por defecto en RSEM). Para el cálculo de la abundancia de transcritos se reportaron todos los alineamientos encontrados para cada fragmento, excluyendo todos aquellos fragmentos con más de 200 alineamientos (parámetro por defecto de RSEM). Se eligió esta estrategia de mapeo, debido a que ha demostrado tratar de óptima manera con las lecturas mapeadas a múltiples transcritos, tanto en pruebas con datos simulados como reales [Li et al., 2011].

3.2.4.3 Evaluación de reproducibilidad y consistencia.

La reproducibilidad y consistencia de las series de tiempo fue evaluada mediante un análisis de correlación utilizando el coeficiente de Spearman. En este análisis de correlación fueron incluidos los 32.099 genes consistentemente detectados y los resultados fueron visualizados con mapas de calor utilizando el paquete Seaborn de Python v2.7. Detalles de estos resultados son informados y discutidos en las siguientes secciones.

3.2.4.4 Remoción de efectos de lote (*Batch effect*)

La remoción de efectos de lote fue aplicada en simultáneo sobre todos los datos utilizados en nuestros análisis (105 librerías de RNA-seq). En primer lugar, las librerías fueron normalizadas utilizando la metodología de transformación estabilizadora de varianza (VST) de DESeq2 [Love et al., 2014]. Posteriormente, fueron filtrados aquellos transcritos con una varianza cercana a cero, y sobre la matriz resultante se aplicó la función Combat del paquete estadístico SVA [Johnson et al., 2007; Leek et al., 2012]. SVA-Combat fue utilizado siguiendo una estrategia para lotes conocidos, con el objetivo de corregir aquellas variaciones biológicas no deseadas entre las distintas series de tiempo y lotes biológicos usados en esta tesis. Finalmente, se comprobó si la reproducibilidad y consistencia había mejorado de la misma manera que en la **Sección 3.2.4.3**.

3.2.4.5 Evaluación de expresión diferencial

En primer lugar, se procedió a filtrar aquellos genes con bajo nivel de expresión y presencia de datos atípicos (*outliers*) que pudiesen ser identificados como falsos positivos en este análisis. Con este fin se seleccionaron para continuar en el análisis solo aquellos genes que tenían en promedio 5 o más lecturas por a lo menos 4 puntos consecutivos en alguna de las tres condiciones estudiadas (transectado, sham o sin daño). Este filtro se aplicó sobre las lecturas normalizadas en base al tamaño promedio de las librerías, considerando así solo aquellos genes que eran consistentemente detectados en base a la profundidad de la secuenciación que se utilizó.

Posteriormente, la expresión diferencial fue evaluada utilizando un análisis de Procesos Gaussianos montado en Python 2.7 y utilizando el paquete GPy [Hensman et al., 2012]. Se

decidió utilizar esta metodología debido a que había sido montada previamente por nuestros colaboradores, y utilizada en datos similares con óptimos resultados [Owens et al., 2016; Forouzmand et al., 2017]. Brevemente, nosotros testeamos la hipótesis de que un gen en la condición X y la condición Y tienen igual expresión en el tiempo, versus la hipótesis de que el gen tiene diferente expresión en el tiempo para ambas condiciones, siendo esta última hipótesis la que implica una expresión diferencial. Con este objetivo, nosotros nos preguntamos si un único modelo de Procesos Gaussianos describe mejor los datos o si dos modelos (un para la condición X y otro para la condición Y) describen mejor los datos. Ejemplos de genes con y sin expresión diferencial son ilustrados en la **Figura 6**.

En este análisis se realizaron tres diferentes comparaciones, **transectado-contra-sham**, **transectado-contra-sin daño** y **sham-contra-sin daño**. Se consideró como diferencialmente expresados aquellos genes que tenían un Criterio de Información Bayesiano (BIC) ≥ 10 en las comparaciones Transectado-VS-Sham y Transectado-VS-Sin daño. Según literatura un BIC ≥ 10 es una fuerte evidencia para la selección de un modelo sobre otro [Raftery, 1995]

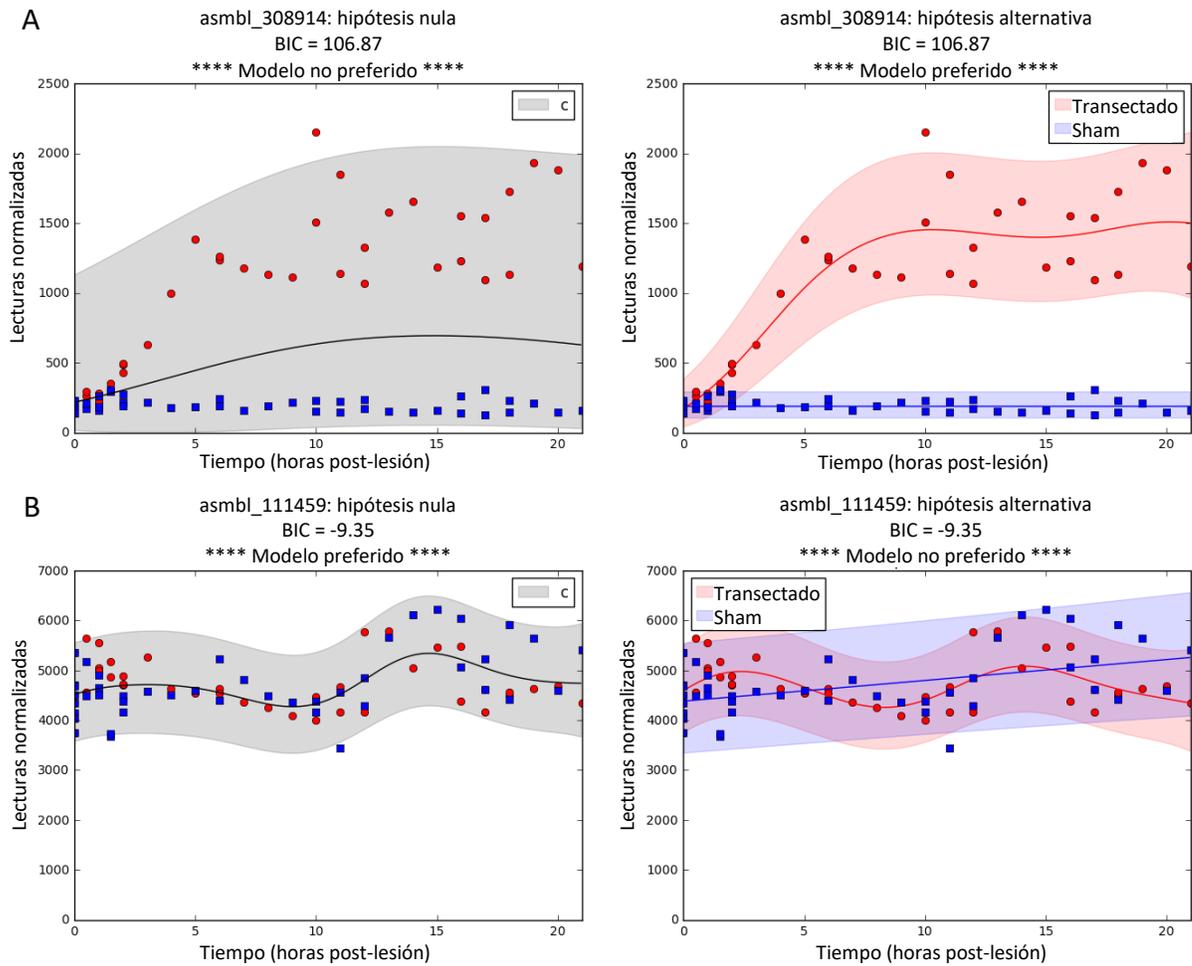


Figura 6. Análisis de expresión diferencial usando Procesos Gaussianos. A. Ejemplo de gen diferencialmente expresado, donde se estadísticamente se prefiere dos hipótesis para modelar las dos condiciones evaluadas. B. Ejemplo de gen sin expresión diferencial donde estadísticamente es preferido un modelo para modelar ambas condiciones.

3.2.4.6 Análisis de redes de co-expresión génica ponderada

Con el objetivo de saber cómo estaba estructurado a nivel modular el transcriptoma temprano luego del daño a la médula espinal aplicamos un análisis de redes de co-expresión génica ponderada utilizando el paquete estadístico de WGCNA (*Weighted Gene Correlation Network Analysis*) [Langfelder y Horvarth, 2008]. Específicamente se decidió elegir este método de agrupamiento debido a que se ha utilizado ampliamente en datos de transcriptómica, con óptimos resultados [Chandran et al., 2016, Lin et al., 2018, Maertens et al., 2018]. Por recomendación de los desarrolladores del paquete, este análisis fue aplicado sobre los datos luego de haber realizado la corrección de efectos de lote [Sitio web de WGCNA]. Se utilizó una matriz que contenía una parte acotada de los datos generados, específicamente se seleccionaron los datos de los genes diferencialmente expresados en la condición transectado ($BIC > 10$ en comparaciones transectado-contra-sham y transectado-contra-sin daño). Este análisis está compuesto de varias etapas. En primer lugar, se calculó una matriz de similitud para los perfiles de expresión génica aplicando el coeficiente de correlación bicor sobre la matriz de cuentas. Posteriormente, esta matriz fue convertida a una matriz de adyacencia aplicando una función para construir redes del tipo *signed-hybrid*:

$$a_{ij} = [cor(x_i, x_j)]^\beta \quad \text{para } cor(x_i, x_j) > 0$$

$$a_{ij} = 0 \quad \text{para } cor(x_i, x_j) \leq 0$$

Este tipo de redes utiliza un umbral suave (*soft-thresholding power*) estableciendo diferentes intensidades en la fuerza de conexión entre los nodos, a diferencia de otros tipos de redes que usan umbrales duros (*hard-thresholding power*) en los cuales se establecen relaciones binarias entre los nodos (Verdadero o Falso) [Langfelder y Horvarth, 2008].

Para escoger una potencia β adecuada para la función de adyacencia se siguió el criterio de topología de escala libre, debido a que la sensibilidad y especificidad de la fuerza de conexión entre pares están directamente relacionada a esta variable. Utilizando un gráfico de potencia β v/s el índice de ajuste a una topología de escala libre (R^2), se escogió el valor β en el cual la curva alcanzaba su punto de saturación o en su defecto un $R^2 \geq 0.8$. Posteriormente la matriz de adyacencia fue utilizada para calcular una matriz de disimilaridad o distancia entre los nodos, sobre la cual se aplicó un método de agrupamiento (hclust) para identificar los módulos que componían nuestra red y así conocer la estructura modular del transcriptoma estudiado [Langfelder y Horvarth, 2008]. Finalmente, la red de co-expresión fue visualizada utilizando Cytoscape [Shannon et al., 2003].

3.2.4.7 Análisis de enriquecimiento de ontología génica

Como primera etapa procedimos a generar una base de datos de términos de ontología génica (GO) asociadas a las secuencias codificantes del transcriptoma modelo v9.1 de *Xenopus laevis*. El primer paso fue alinear las secuencias codificantes del transcriptoma modelo a un subconjunto de la base de datos NR de NCBI [Pruitt et al., 2006] mediante BlastP [Camacho et al., 2009] para identificar las proteínas codificadas en cada uno. Este subconjunto contenía las secuencias codificantes de proteínas descritas para humano, ratón, pez cebra, gusano, pollo y mosca. El segundo paso fue identificar los dominios proteicos contenidos en las secuencias codificantes de estos transcritos utilizando InterProScan [Quevillon et al., 2005]. Esto con el objetivo de asociar nuevas categorías de ontología génica que pudiesen estar relacionadas a estos dominios proteicos. Posteriormente, esta información fue recopilada

en Blast2GO [Conesa et al., 2005], donde fueron anotados los términos de ontología génica reportadas previamente para las proteínas y dominios proteicos identificados.

Una vez finalizada la base de datos se procedió a realizar un test exacto de Fisher con ClusterProfiler [Yu et al., 2012] para calcular en cada módulo el enriquecimiento de términos de ontología génica. Este análisis fue hecho solo para aquellos genes con un valor de correlación al módulo asignado (*Module Membership*, MM) ≥ 0.6 . Los términos identificados en cada módulo de co-expresión fueron comparadas respecto al transcriptoma basal de la médula espinal, el cual definimos como aquellos genes que tenían 1 o más lecturas en todas las librerías de las series de tiempo de la condición sin daño. Fueron determinadas como enriquecidos los términos ontológicos con una significancia estadística (valor-p) ≤ 0.01 en el test exacto de Fisher.

Con el objetivo de reducir el número de categorías enriquecidas y facilitar la visualización de los resultados aplicamos los siguientes procesos a cada módulo. En primer lugar, fueron seleccionados solo aquellos terminos que cumpliesen al menos uno de los siguientes criterios: (1) tener un conteo de al menos 5 genes en el módulo, (2) contener al menos el 15% de los genes en el módulo o (3) contener al menos el 15% de los genes identificados para la categoría en transcriptoma basal. Luego, con ayuda del paquete GOATOOLS [Klopfenstein et al., 2018] calculamos la similitud semántica entre las categorías seleccionadas. En tercer lugar, generamos una matriz binaria de presencia o ausencia de genes en la categoría enriquecida y posteriormente calculamos una matriz de disimilitud utilizando el coeficiente de Dice. Esta fue en seguida transformada a una matriz de similitud y concatenada a la matriz de similitud semántica. Posteriormente, sobre la matriz resultante se hizo una

reducción de variables utilizando un Análisis de Componentes Principales y se procedió a realizar un análisis de agrupamiento DBSCAN (*Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise*). Se eligió este tipo de agrupamiento, debido a que nos permitiría agrupar categorías similares y a la vez mantener fuera de los agrupamientos a categorías de ontología génica no relacionadas a los grupos identificados, es decir, no forzaríamos a ninguna categoría a ser parte de un grupo al cual por similitud no pertenece. Finalmente, la categoría representativa de cada grupo identificado en el agrupamiento DBSCAN fue elegida en base al mayor valor-x, el cual fue definido como:

$$valor - x_{término GO} = -LOG(valor - p)_{término GO} \times \sum BIC_{término GO}$$

En el caso de los términos GO que no fueron agrupados, fueron incluidas en la visualización aquellas con un valor-x dentro del rango de los grupos identificados.

3.2.4.8 Análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG

En una primera etapa las secuencias codificantes de los genes diferencialmente expresados fueron mapeados al proteoma humano utilizando BlastP [Camacho et al., 2009]. Luego a cada uno de estos genes se les asignó el código NCBI de proteína humana a la cual tenían la mayor identidad de secuencia. Posteriormente, estas proteínas fueron mapeadas a la base de datos de vías de señalización de la Enciclopedia Kioto de Genes y Genomas (KEGG), debido a que esta base de datos recopila y organiza la información conocida para cada vía, y específicamente las correspondientes a humanos fueron elegidas debido a que tienden a ser las más completas debido a los innumerables trabajos existentes. Finalmente, se calculó un enriquecimiento de estas vías de señalización dentro de los módulos aplicando un test exacto de Fisher con

ClusterProfiler [Yu et al., 2012]. Se definieron como enriquecidas todas aquellas vías de señalización con una tasa de descubrimientos falsos (FDR) ≤ 0.05 .

3.2.4.9 Análisis de enriquecimiento de motivos (Analysis of Motif Enrichment, AME)

Para el análisis de enriquecimiento de motivos o sitios de unión de factores de transcripción (TFBS), buscamos si existía un enriquecimiento de motivos reportados previamente en vertebrados (Bases de datos Uniprobe, Jaspar, 2018 y Jolma, 2013) utilizando *AME enrichment* del paquete MEME-Suite [Newburger y Bulyk, 2008; Khan et al., 2017; Jolma et al., 2013; McLeay y Bailey, 2010]. En este enriquecimiento comparamos los promotores proximales de cada módulo contra un grupo control de promotores proximales elegidos aleatoriamente. Este grupo control variaba entre cada análisis y estaba compuesto por tres veces el número de promotores proximales presentes en el módulo contra el cual se realizaba el enriquecimiento. Para este análisis, en primer lugar hicimos una base de datos con los promotores proximales, o primeros 1500 pb antes del sitio de inicio de la transcripción para todos los transcritos del transcriptoma modelo [Mina et al., 2015]. La extracción de los promotores se hizo desde el genoma de *X. laevis* v9.1 (Xenbase) utilizando Bedtools [Quinlan, 2014]. Se consideraron todos aquellos enriquecimientos con un valor-p ≤ 0.05 .

3.2.4.10 Construcción de redes de interacción proteína-proteína

Las redes de interacción proteína-proteína fueron construidas utilizamos la base de datos de interacciones BioGRID v3.4.151 [Stark et al., 2006], la cual contiene solo interacciones comprobadas experimentalmente. Las interacciones fueron filtradas en base al símbolo de cada gen. Adicionalmente la identificación de factores de transcripción se hizo alineando las secuencias codificantes de los genes diferencialmente expresados contra la base de datos de

dominios proteicos Pfam [Finn et al., 2013]. Este alineamiento fue corrido con HMMER v3.4 [Johnson, 2010] y se filtraron los 68 dominios de unión a ADN reportados previamente en Blitz et al., 2017. Finalmente, la red fue visualizada utilizando Cytoscape [Shannon et al., 2003].

3.2.5 Validación de genes y vías de señalización

3.2.5.1 Transcripción Reversa (RT) y PCR cuantitativo (qPCR)

Las muestras de ARN para RT-qPCR se prepararon de igual manera que las utilizadas en secuenciación masiva, utilizando los mismos cuidados para mantener la sincronización durante el muestreo. Mismo método de preservación, extracción y cuantificación de ARN. El ADN complementario (ADNc) se preparó utilizando la reacción descrita en la **Tabla 2**. En una primera etapa 100 ng de ARN fueron diluidos a 9 μL con agua libre de nucleasas y fueron incubados juntos a 1 μL de Oligo-dT por 5 minutos a 65°C. Posteriormente se agregó el resto de los reactivos y se incubó por 2 horas a 42°C.

Tabla 2. Reacción utilizada para transcripción reversa.

Reactivo	Concentración	Vol. 1 Reacción
Amortiguador RT M-MLV	5X	4 μL
dNTPs	10 mM	1 μL
DTT	100 mM	2 μL
BSA	1 mg/mL	2 μL
RT M-MLV	200 u/ μL	1 μL
ARN		-
Oligo-dT	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 μL
H ₂ O		-
Total		20 μL

Posteriormente se procedió a realizar una reacción de PCR cuantitativo utilizando la reacción descrita en la **Tabla 3**. Para cada reacción se utilizó una dilución 1:5 del ADNc obtenido en la etapa previa y las reacciones de qPCR fueron corridas en replicado técnico. La

reacción fue corrida en un termociclador de tiempo real EcoTM Illumina siguiendo un programa compuesto de una etapa inicial de denaturación de 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de dos etapas, denaturación (95°C x 15 segundos) y apareamiento/extensión (60°C x 30 segundos). Todas las cuantificaciones por qPCR utilizaron como control de carga la expresión del gen *eef1a1*, el detalle de los partidores utilizados en estas reacciones es informado en la **Tabla 4**.

Tabla 3. Reacción utilizada para reacción de PCR cuantitativo.

Reactivos	Concentración	Vol. 1 reacción
Maxima SYBR qPCR Master Mix	2X	7.5 µL
Primers	10 µM	0.4 µL
ADNc	0.2X	1 µL
H ₂ O		6.1 µL
Total		15 µL

Tabla 4. Partidores utilizados en validaciones por PCR cuantitativo.

Gen blanco	Orientación	Secuencia
socs3.L	Sentido	TGCTGACCCAGGGATCTTA
socs3.L	Antisentido	AAACACACAATTCCCGCAGC
smad3.L	Sentido	GGCTGTGTATCAGCTTACGAGA
smad3.L	Antisentido	CAGGGGGTGCTAGTCACAGT
fos.L	Sentido	GGAAAGAAATAAGATGGCAGCA
fos.L	Antisentido	TTCTGGTCTCCAGGTCATC
fosl1.L	Sentido	TCGCAAAGAGCTGACAGATT
fosl1.L	Antisentido	TTTCTGCTTTTGCACTCAG
asmb1_27531	Sentido	GCACTGTGGCTCCTTTTACC
asmb1_27531	Antisentido	AGTTCCTTGCAATGGGGTTT
runx1.L	Sentido	AGGAAGGGCAAGCAGTATGA
runx1.L	Antisentido	AATGCCAACTCGAGGATCAC
inhba.L	Sentido	TGTCATTGCAGGAAGAGCAG
inhba.L	Antisentido	TGGAAATTTCAAAGCGCAGT
eef1a1.L	Sentido	CACCTAGTCGCCCAACTGAT
eef1a1.L	Antisentido	GACACCAGTTTCCACACGAC

Para comprobar si existía una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de los genes evaluados entre las condición transectado y sham, el Log_2 de la razón entre ambas condiciones fue comparado a un valor teórico 0 mediante la prueba-U de Mann-Whitney para datos no paramétricos en GraphPad Prism [Swift, 1997].

3.2.5.2 Western Blot

Para la preparación de muestras de proteína utilizadas en estos ensayos se utilizaron 10-12 secciones caudales de médula espinal. Una vez aisladas, el material biológico fue conservado en amortiguador RIPA, al cual se le agregó un conjunto de inhibidores de proteasas (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo 1X, Benzamidina 1 mM, Ortovanadato de Sodio 200 μ M, Leupeptina 100 μ g/mL, Pirofosfato de Sodio 200 μ M) previo a su utilización. Una vez finalizado el muestreo, las médulas espinales fueron homogenizadas y luego centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos para sedimentar los restos celulares y facilitar el rescate del sobrenadante. Las proteínas fueron cuantificadas con el Micro BCATM Protein Assay Kit (Cat#23235). La absorbancia de las muestras fue medida a 562 nm usando el equipo Epoch®. Posteriormente se corrió una electroforesis en geles de Acriladida/Bisacrilamida (A/BA) a 100V por 2 horas o hasta que hubiese caído el frente de corrida. Se cargaron 10 μ g de proteínas por muestra en cada corrida, utilizamos geles al 12% para S6, pS6 y Sox2 y geles al 15% para 4E-BP1 y p4E-BP1.

Posterior a la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF durante 2 horas a 350 mA utilizando un amortiguador de transferencia. Una vez finalizada la transferencia las membranas fueron bloqueadas por calor a 65 °C por 5 minutos en estufa, posteriormente reactivadas con metanol y lavadas con agua destilada previo a la incubación

del anticuerpo primario. Estos anticuerpos fueron diluidos en TBST - BSA 3% según las concentraciones reportadas en la **Tabla 5** e incubados durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBST a temperatura ambiente (TA) para retirar los excesos de anticuerpo y posteriormente se procedió a incubar el anticuerpo secundario 1:2000 en TBST – BSA 3% por 2 horas a TA. Finalmente, la membrana fue lavada 3 veces con TBST y rebelada por quimioluminiscencia en el equipo iBright®.

Tabla 5. Anticuerpos.

Proteína blanco	Proveedor	# Catálogo	WB	IFI	Incubación con metanol (IFI)
p-S6 (S240/244)	Cell-Signaling	2215	1:1.000	1:200	SI
S6	Cell-Signaling	2211	1:1.000	1:200	
p-4E-BP1 (T37/46)	Cell-Signaling	2855	1:1.000	1:100	SI
4E-BP1	Cell-Signaling	9644	1:1.000	1:100	
p-cJun (S243)	Abcam	ab28846		1:500	
Sox2	Cell-Signaling	4900S	1:1.000	1:200	
PCNA	Leica	NCL-L-PCNA		1:100	
Islet-1	DSHB	39.4D5		1:200	
p-Smad3 (S423/425)	ThermoFisher	MA5-14936		1:100	SI
α-Tubulina	Abcam	ab7291	1:50.000		
Alexa 488	Invitrogen	A11001		1:500	
Alexa 555	Invitrogen	A21422		1:500	
Alexa 635	Invitrogen	A31577		1:500	
IgG-Mouse, HRP	Invitrogen	32430	1:2000		
IgG-Rabbit, HRP	Invitrogen	31460	1:2000		

3.2.5.3 Criosecciones

Con el objetivo de preparar las muestras de tejido para las criosecciones, en primero lugar los animales fueron fijados en PBS 1% conteniendo PFA 4% durante la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X para retirar el exceso de PFA y posteriormente se delimitó la zona de interés, la cual consiste en la región comprendida entre los ojos y los miembros posteriores del renacuajo. Posteriormente se procedió a realizar la deshidratación de tejido mediante tres incubaciones consecutivas de 1 hora con PBS 1X -

Sacarosa 5%, 10% y 20%. Luego de la deshidratación los animales fueron incubados en una solución de OCT - PBS–Sacarosa 20% en una razón 1:1 por una hora, seguido por una segunda incubación en OCT 100% por 1 hora y finalmente congelados con ayuda de nitrógeno líquido. Con la ayuda de un criostato (Leica CM1850), se realizaron cortes transversales o longitudinales de los animales según la necesidad, estos tenían un espesor de 10 μm y se situaban a 100 μm de distancia del siguiente corte. Tanto los cortes como los animales en OCT sin cortar fueron mantenidos a -80°C .

3.2.5.4 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

En una primera etapa, el área que contiene a las criosecciones fue delimitada en el portaobjetos utilizando un lápiz hidrófobo. Luego, los portaobjetos fueron incubados por 10 minutos a -20°C en metanol para eliminar auto-fluorescencia (Opcional, **Tabla 5**). Posteriormente las criosecciones fueron permeabilizadas por 10 minutos en PSBT 0,02% (PBS 1X – 0.02% Tritón). Luego de esto se procedió a realizar un bloqueo por 10 minutos a TA utilizando una solución de PBST 0,02% – 10% de suero de cabra inactivado (solución de bloqueo). Esto fue seguido de la incubación del anticuerpo primario en solución de bloqueo a 4°C durante la noche, ambos procedimientos fueron realizados en una cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron 3 lavados en PBST 0,02% por 10 minutos cada uno, seguidos de la incubación del anticuerpo secundario en solución de bloqueo por 2 horas a TA en la cámara húmeda. Una vez finalizada esta incubación se realizaron otros 3 lavados en PBST por 10 minutos cada uno, seguidos por la tinción de núcleos con PBST 0,02% – Hoechst 1:10.000 por 5 minutos. Finalmente, previo al montaje se retiró el exceso de líquido de los portaobjetos con papel absorbente, luego las criosecciones fueron bañadas con medio de montaje para muestras

fluorescentes (VECTASHIELD® H-1000), cubiertas con un cubreobjetos, selladas con esmalte de uñas transparente y mantenidas a 4°C. Las IFI fueron analizadas con el microscopio confocal Fluoview FV10i Olympus [Tapia et al., 2017, Mendez-Olivos et al., 2017].

3.2.5.5 Co-electroporación de vectores plasmidiales

La co-electroporación de los vectores CAG::EGFP y 12xCAGA-CMV::nls-mCherry se realizó 24 horas previas a la transección de los animales. Para este procedimiento los animales fueron anestesiados y posteriormente inyectados 20 veces con un capilar de vidrio previamente calibrado para liberar 4 nL en cada inyección. Para facilitar este proceso el ADN plasmidial disuelto en agua destilada (5 µg/µL) es teñido con fastgreen (1:10) e inyectado en las paredes de la médula (10 veces) y el canal central (10 veces) con el microinyector PM1000, específicamente en la zona torácica donde se realizará la transección. Posteriormente los electrodos de platino fueron situados en la zona de la inyección con ayuda de un micromanipulador y se procedió a dar 5 pulsos de 12 ms y 34V a intervalos de 200 ms, en seguida el electrodo fue invertido para una segunda ronda de pulsos. Se han dado dos rondas invirtiendo el electrodo debido a que utilizamos un electroporador monopolar ECM830. Luego de la electroporación los animales fueron recuperados en Barth 0.1X + antibióticos y dejados por 24 horas hasta realizar la transección.

Los animales fueron fijados 24 horas después de la transección de la misma manera que en la **Sección 3.2.5.3**. Sin embargo, después de la fijación se hizo un montaje completo de la médula espinal y aprovechando que ambos vectores expresaban proteínas fluorescentes, estas fueron observadas directamente en el microscopio confocal. Posteriormente se procedió a

contar el número de células marcadas y doblemente marcadas utilizando ImageJ [Abràmoff et al., 2004].

3.2.5.6 Ensayos de recuperación de nado

Para evaluar la recuperación del nado luego del tratamiento con rapamicina, animales transectados fueron incubados en placas de petri con Barth 0.1X - DMSO 0.1% - rapamicina 10 μ M y los animales transectados control en placas de petri con Barth 0.1X - DMSO 0.1%, ambas incubaciones durante 21 horas. Posteriormente los animales fueron traspasados a cajas de crecimiento con 1L de Barth 0.1X + antibióticos y supervisados a diario durante el curso del experimento. La capacidad de nado fue evaluada con el software Anymaze, midiendo el nado durante 5 minutos, posterior a una etapa de adaptación de 5 minutos [Muñoz et al., 2015; Edwards et al., 2017]. La distancia de nado de los animales tratados con rapamicina fueron comparados con los controles utilizando una prueba-U de Mann-Whitney para datos no paramétricos en GraphPad Prism [Swift, 1997].

4 Resultados

4.1 Identificación de los cambios globales del transcriptoma desplegados en la médula espinal durante las primeras 21 horas posteriores al daño

4.1.1 Obtención de material biológico

Como una primera etapa para la realización de los perfiles de expresión de alta resolución temporal procedimos a obtener el material biológico necesario para su construcción. A través de 8 diferentes procesos de muestreo recolectamos el material biológico para preparar 108 muestras de ARN total. Estas corresponden a 36 muestras para la condición transectado, 36 para la condición sham, 8 tiempos 0h, es decir animales sin daño, los cuales fueron compartidos por las dos condiciones antes mencionadas, y 28 muestras de animales sin daño (los detalles temporales de la obtención de muestras se describen en la **sección 3.5.3.1 de Materiales y Metodologías** e ilustrados en la **Fig. 4**).

Para las series piloto S1 y S2, en las cuales se realizó un muestreo a partir de 10 individuos diferentes por punto, se obtuvo un rendimiento promedio de $956,1 \pm 587,9$ ng mientras que para el resto de las series S3-8, en las cuales se muestreo 12 individuos diferentes por punto, se obtuvo un rendimiento promedio de $2607,0 \pm 1212,4$ ng. En cuanto a la evaluación de pureza e integridad, el conjunto total de muestras presento una razón 260/280 de $2,1 \pm 0,1$ y un valor de Integridad de ARN (RIN) de $9,5 \pm 0,4$, ambos valores son adecuados para muestras de ARN puras e integras respectivamente. Sin embargo, no nos fue posible medir el RIN en 16 de las 108 muestras preparadas, 15 de estas corresponden a los ensayos piloto (S1 y S2), donde debido a los bajos rendimiento debimos priorizar por la preparación de las librerías, no obstante, pudimos medir el RIN en 5 de las 20 muestras de estas series obteniendo un valor promedio de 10. Por otra parte, durante la medición del RIN de la serie

S4 tuvimos algunos problemas técnicos y algunas muestras debieron ser repetidas debido a los bajos valores que entregaron respecto al promedio de la serie (9.1), obteniendo un valor similar a este en la segunda medición. Sin embargo, no fue posible medir el RIN la muestra 11h-sham de esta serie. Los detalles de rendimiento, pureza e integridad para cada muestra son informados en el Apéndice 1.

4.1.2 Preparación y secuenciación de librerías

Para cada muestra de ARN se construyeron librerías para secuenciación de ARNs poliadenilado. La calidad de estas preparaciones fue chequeada mediante Bioanalyzer 2100 obteniendo un tamaño promedio aproximado de los fragmentos de 300 pb. En el Apéndice 2 se muestran dos electroferogramas representativos de nuestras librerías Illumina.

Las librerías fueron secuenciadas usando la plataforma HiSeq 2000 de Illumina, obteniendo un promedio de 28 millones de lecturas pareadas de 50-51 pb para cada una de estas. La calidad de estas secuenciaciones fue chequeada con FASTQC y el 95.9% de las lecturas reportó en promedio un valor de calidad de secuencia (*Q Score*) mayor o igual a 30, es decir, una exactitud del 99.9% en el nucleótido. De las lecturas restantes, el 2,6% tuvo una calidad promedio mayor o igual a 20 y menor a 30, lo cual nos indica una exactitud entre el 99 - 99,9% aproximadamente en el nucleótido secuenciado. Por otra parte, a nivel de nucleótidos obtuvimos un valor promedio de calidad de secuenciación de 37,1, mientras las bases N fueron un 0.1%. El detalle de estos parámetros de calidad para cada librería es informado en el Apéndice 1.

4.1.3 Mapeo de librerías a base de datos de transcritos

Para determinar el nivel de expresión génica las librerías fueron mapeadas al transcriptoma modelo de *X. laevis* v9.1 obtenido desde Xenbase [Bowes et al., 2007]. Este transcriptoma está compuesto por 45.099 transcritos primarios y tiene un tamaño aproximado de 109 Mbp, de esta manera, considerando un promedio de 28 millones de lecturas pareadas por librería logramos una cobertura aproximada del transcriptoma de 25,6 veces. El mapeo se realizó utilizando Bowtie-RSEM y obtuvimos un promedio de 69% de lecturas alineadas al transcriptoma por librería, lo cual corresponde en promedio a $19,18 \pm 8,00$ millones de lecturas mapeadas en cada una de estas. Este resultado fue comparable entre las condiciones estudiadas, con un promedio de $19,06 \pm 10,50$, $18,07 \pm 6,50$ y $20,18 \pm 8,00$ millones de lecturas mapeadas para las condiciones transectado, sham y sin daño respectivamente. Los datos de genoma y transcriptoma de *X. laevis* aún siguen en desarrollo, lo cual podría explicar el 31% de lecturas no mapeadas. El detalle de los porcentajes mapeados por cada librería es informado en el Apéndice 1.

Por otra parte, fue posible detectar 43.193 transcritos de los 45.099 que componen el transcriptoma utilizado, es decir, que se mapeó al menos una lectura en estos transcritos primarios. De estos transcritos, 42.100, 41.955 y 41.236 fueron detectados en las condiciones transectado, sham y sin daño respectivamente.

En esta etapa aplicamos un primer filtro, seleccionando solo aquellos genes que eran detectados de manera consistente durante el mapeo, estableciendo para esto el criterio de 5 o más lecturas mapeadas en promedio en cuatro o más puntos consecutivos en algunas de las tres condiciones estudiadas (transectado, sham o sin daño). Así, fueron consistentemente

detectados 30.299 genes, de los cuales 29.745, 29.277, 29.019 fueron detectados en las condiciones transectado, sham y sin daño, respectivamente. El objetivo de este primer filtro era eliminar todos aquellos genes de baja o nula expresión con algún valor atípicamente alto, los cuales podrían generar algún falso positivo en análisis posteriores.

4.1.4 Evaluación de ensayo piloto

Con las muestras del ensayo piloto se hizo una evaluación para comprobar si los perfiles de expresión génica obtenidos por qPCR eran equivalentes a lo obtenido en el RNA-seq. Para esta propuesta se preparó ADNc de cada muestra de las series S1 y S2 utilizando 50 ng de ARN y posteriormente se procedió a evaluar la expresión del transcrito de *socs3* por qPCR y se comparó a los datos obtenidos para este gen en el RNA-seq (**Fig. 7**). Los resultados obtenidos entre ambas técnicas muestran un comportamiento cinético similar. En ambos casos se observa un rápido aumento en la condición transectado alcanzando un máximo a 1,5 horas post transección (hpt), sin embargo, en los resultados del RNA-seq se observa una ligera caída a las 2 hpt. Por otra parte, la cinética de la condición sham pareciese ser similar en ambos casos. Comparando ambas técnicas, los resultados de la condición transectado tienen una correlación de Pearson de 0.88 mientras la condición sham tiene una correlación de 0.93. Aparentemente los resultados serían similares, sin embargo, es posible apreciar una mayor dispersión en los resultados obtenidos por qPCR.

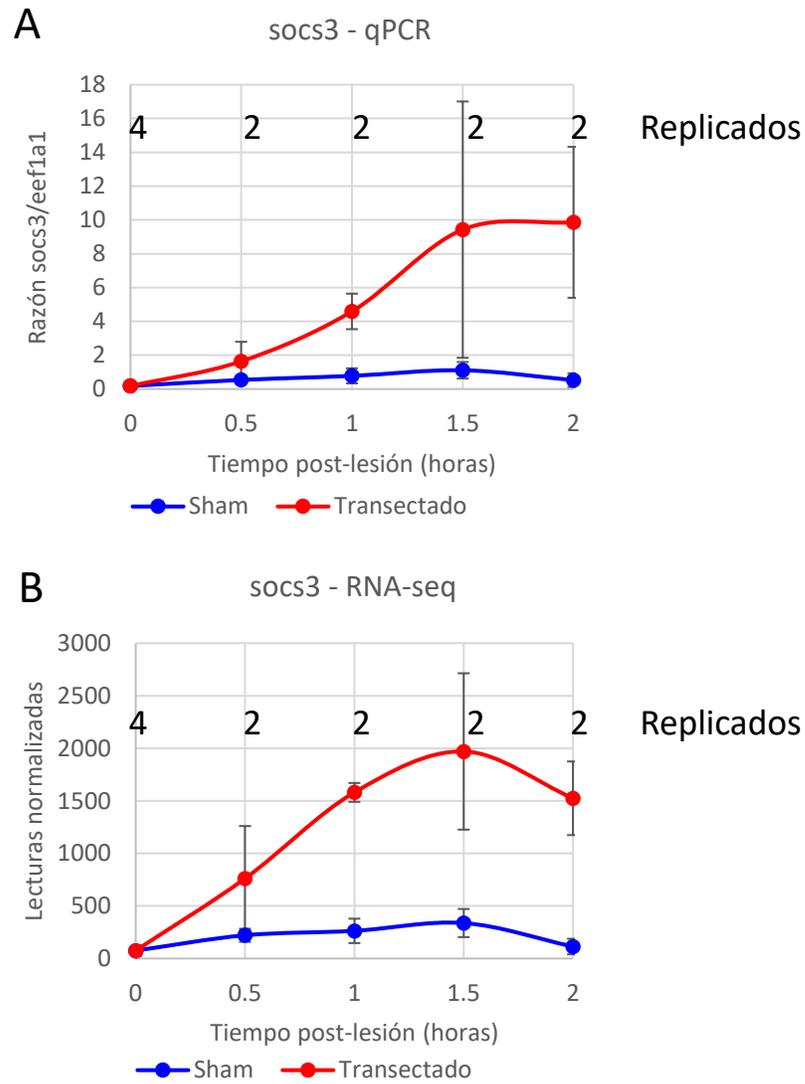


Figura 7. Comparación de los niveles de mRNA de socs3 utilizando RT-qPCR y RNA-seq. A. Perfil de expresión de *socs3* evaluado por qPCR. B. Perfil de expresión de *socs3* evaluados por RNA-seq.

4.1.5 Evaluación de consistencia y reproducibilidad y remoción de efectos de lote

La consistencia de las secuenciaciones y la reproducibilidad entre los puntos de solapamiento de estas fueron evaluadas mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Un coeficiente de correlación expresa el grado de asociación entre dos variables, según el sentido de la relación de estas en términos de aumento o disminución [Martínez et al., 2009]. Para las condiciones transectado y sham observamos una baja reproducibilidad en los replicados biológicos, especialmente durante las primeras horas del ensayo, esto puede ser observado en las **Figuras 8A y 9A**. En estas no apreciamos que exista una correlación más estrecha entre los replicados biológicos respecto al resto de las librerías. Los replicados biológicos son destacados con cuadros negros en los mapas de calor combinados de las tres condiciones (**Fig. 8A, 9A y 9B**).

Por otra parte, para las condiciones transectado y sham existe cierta consistencia dentro de las series de tiempo. Para la condición transectado observamos que los mapas de calor de las series individuales muestran una correlación interna más homogénea, indicando una mayor similitud entre estas librerías. Esto respecto a las mayores diferencias que pueden ser apreciadas a nivel de correlación entre librerías de distintas series de tiempo en el mapa de calor combinado (**Fig. 8A**). Para la condición sin daño existe una alta consistencia dentro de los resultados, con correlaciones bastante homogéneas, no obstante, ambos replicados de 12 horas parecieran ser muy distintos al resto de las secuenciaciones de esta condición (**Fig. 9B**).

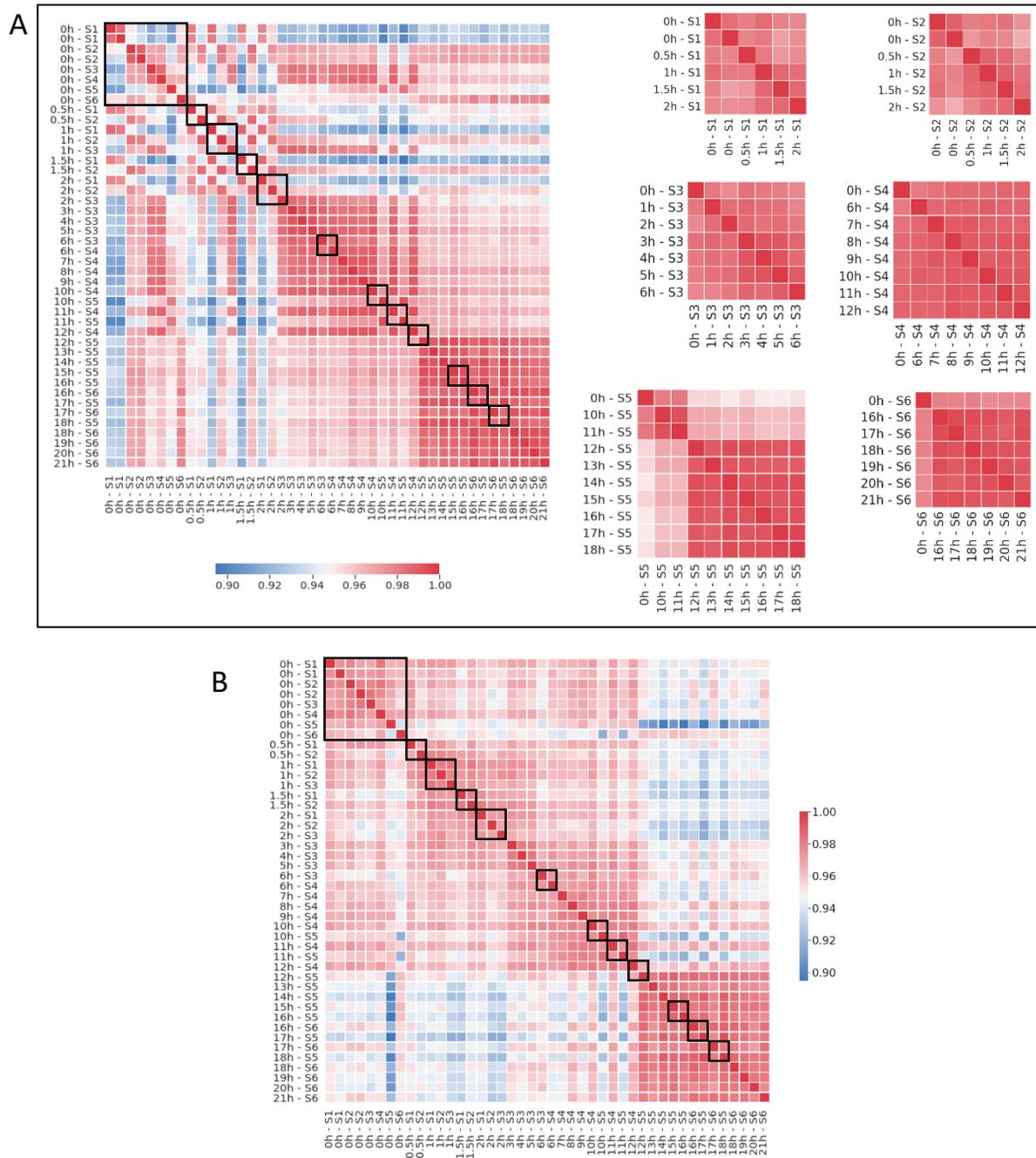


Figura 8. Análisis de consistencia y reproducibilidad de las librerías de la condición transectada. A. Mapa de calor del coeficiente de correlación de Spearman entre las librerías de la condición transectada previo a la remoción de efectos de lote. En el mapa de la izquierda se observa la correlación de todas las series combinadas, mientras a la derecha, las series de manera individual. B. Mapa de calor del coeficiente de correlación de Spearman aplicado sobre las librerías de la condición transectada luego de remover los efectos de *lote* mediante SVA-Combat. En ambos casos los replicados biológicos de las series son destacados con cuadrados negros.

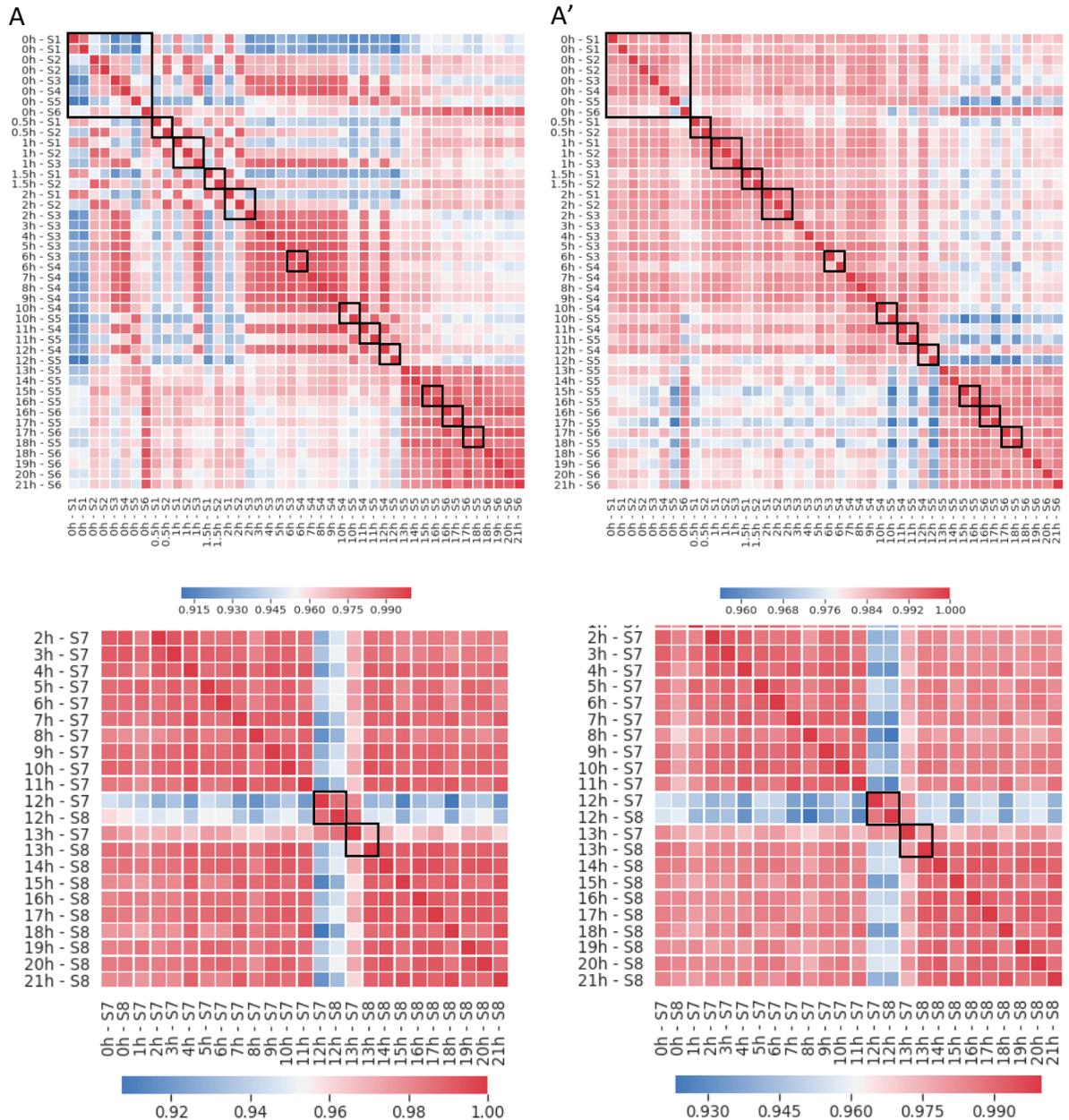


Figura 9. Análisis de reproducibilidad de las librerías de las condiciones control. A-A'. Mapa de calor del coeficiente de correlación de Spearman entre las librerías de la condición sham previo a la remoción de efectos de lote (A) y posterior a este (A'). B-B'. Mapa de calor del coeficiente de correlación de Spearman entre las librerías de la condición sin daño previo a la remoción de efectos de lote (B) y posterior a este (B'). En todos los casos los replicados biológicos de las series son destacados con cuadrados negros.

A nivel individual de genes los resultados son similares, ya que algunos perfiles de expresión fallaron para unirse limpiamente, aunque era posible observar cierta tendencia. Esta observación fue más evidente para perfiles de expresión de la condición transectada, sin embargo, se observa solo en algunos genes (ver ejemplos en **Fig. 10A, B, C**). Nuestros colaboradores habían tenido similares observaciones entre los puntos de solapamiento de dos series de tiempo realizadas en una de sus investigaciones (Collart et al., 2014).

Las observaciones anteriores nos hacían suponer que estábamos frente a un efecto de lote, por lo cual decidimos remover las diferencias identificadas entre las distintas series de tiempo aplicando SVA-Combat [Leek et al., 2012], una herramienta bioinformática para corregir efectos de lote. La corrección la hicimos sobre el conjunto de datos generados en nuestras secuenciaciones. Posteriormente evaluamos de nuevo las librerías aplicando el coeficiente de correlación de Spearman y observamos una mejora en la correlación de los puntos de solapamiento para las condiciones transectado y sham. En las **Figuras 8B y 9A'** se puede observar una mayor homogeneidad en las correlaciones de los recuadros que destacan los replicados biológicos. Sin embargo, no fue posible lograr una mejora en la correlación de los replicados de 12 horas de la condición sin daño respecto al resto de los puntos temporales de estas series de tiempo (**Fig. 9B'**). También fue posible observar una mejora en la continuidad de los perfiles de expresión génica individuales, sin afectar aquellos perfiles de expresión que no eran influenciados notoriamente por los efectos de lote (**Fig. 10A',B',C'**).

Después de Remoción de efectos de lote

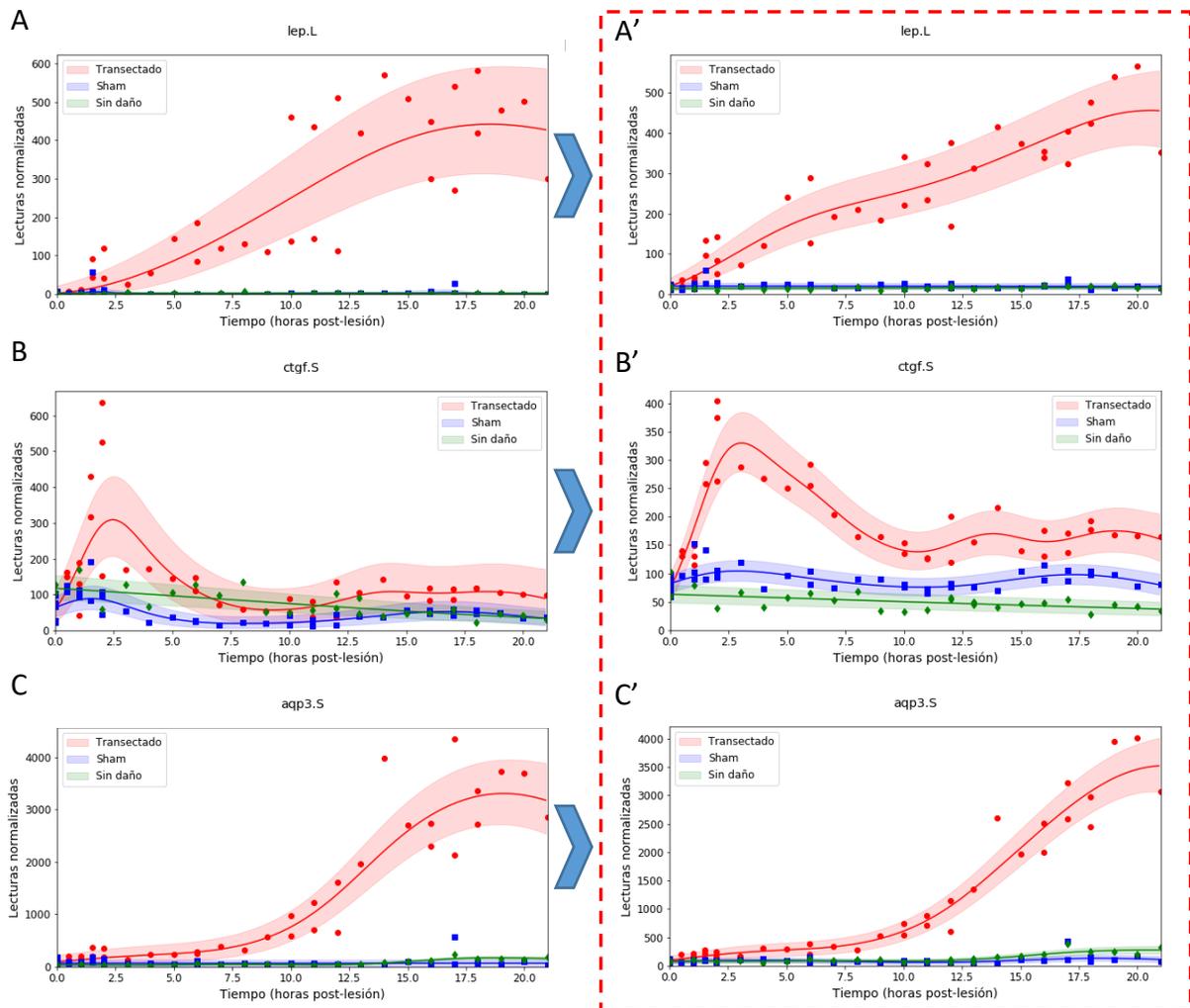


Figura 10. Comparación de perfiles de expresión génica antes y después de la remoción de efectos de lote. Perfiles de expresión de dos genes fuertemente afectados por los efectos de lote, leptin (homeoalelo L) y ctgf (homeoalelo S), y aqp3 (homeoalelo S), el cual muestra ligeros efectos. A',B',C' muestran sus tres perfiles de expresión posterior a la remoción de los efectos de lote.

4.1.6 Evaluación de genes diferencialmente expresados en respuesta a un daño a la médula espinal

Para identificar a aquellos genes que cambian su expresión por un daño directo a la médula espinal, los perfiles de expresión génica de todos aquellos genes detectados de manera consistente en alguna de las tres condiciones evaluadas fueron sometidos a un análisis de Procesos Gaussianos. Este análisis comparó los perfiles de expresión de la condición transectada de manera independiente con cada una de las dos condiciones control utilizadas (*sham* y sin daño), estableciendo como diferencialmente expresados a aquellos genes con un Criterio de Información Bayesiano (Bayesian Information Criterion, BIC) ≥ 10 en el análisis estadístico (**Detalles en Materiales y Metodologías, sección 3.2.4.5**). Escogimos un BIC ≥ 10 como umbral de corte para seleccionar a aquellos genes que luego de la transección tenían notorias diferencias respecto a los controles.

Se identificaron 4.917 genes diferencialmente expresados (GDEs) al comparar las condiciones transectada y sin daño y 2.269 en la comparación transectada y *sham*. Interesantemente, el número de genes diferencialmente expresados es 2.2 veces mayor cuando se compara la condición transectada a los animales sin daño que cuando se hace al control *sham*. Esto demuestra la influencia que puede tener el daño de tejidos cercanos a médula espinal sobre el transcriptoma de esta.

Sin embargo, como nuestro objetivo era identificar aquellos genes desplegados por un daño directo en la médula espinal, se decidió seleccionar la intersección de ambas comparaciones, definiendo como diferencialmente expresados por un daño directo a la médula espinal a aquellos genes con un BIC ≥ 10 en ambas comparaciones. De esta manera, se

identificaron 1.850 genes que cumplían tanto con el requisito de detección consistente como con un $BIC \geq 10$ tanto para las comparaciones transectado con sham y transectado y sin daño.

Para visualizar la respuesta del transcriptoma luego de la lesión, generamos un histograma 2D (**Fig. 11**), en el cual se puede observar la distribución de BICs para ambas comparaciones en todos los genes consistentemente detectados. En este se destacan los GDEs y a su vez también se pone énfasis en aquellos genes con los mayores cambios detectados ($BIC \geq 60$ en ambas comparaciones), los cuales son informados en mayor detalle en la **Tabla 6** y además sus perfiles de expresión son ilustrados en el Apéndice 3. Los valores de expresión diferencial para cada uno de los genes identificados en las tres comparaciones realizadas son informados en <https://drive.google.com/file/d/1napSKJKZ1YUG-XJJP5jQR27K-1iEbOsy/view>

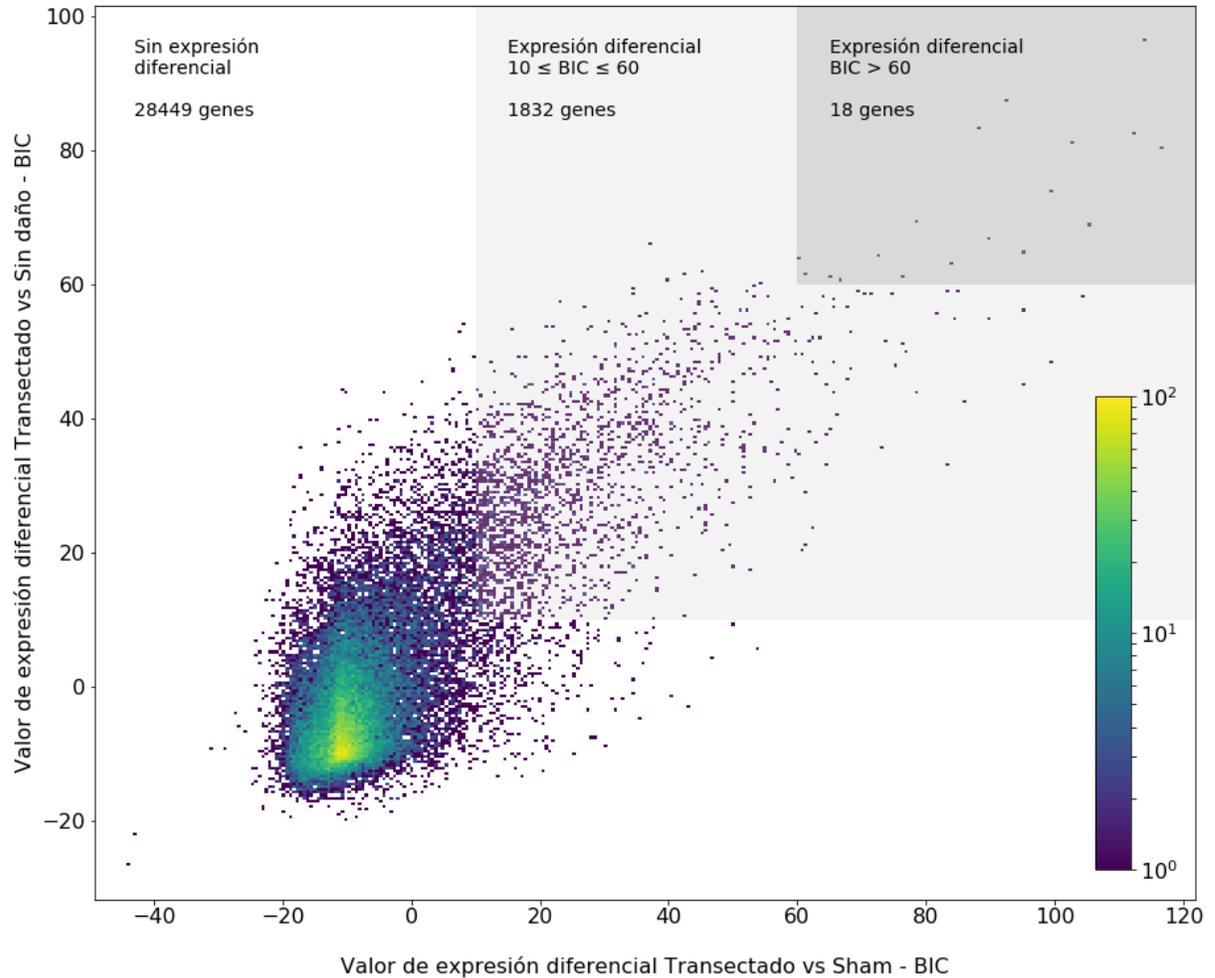


Figura 11. Visualización global de los niveles de mRNA luego de la lesión. En el eje Y se informa el BIC para la comparación transectado-vs-sin daño mientras en el eje X se informa el BIC para la comparación transectado-vs-*sham*. En el cuadrado gris claro se destacan todos aquellos genes con un $\text{BIC} \geq 10$ en ambas comparaciones, mientras en el rectángulo gris oscuro se destacan aquellos genes con los mayores cambios luego de la lesión (Tabla 5.2.4).

Tabla 6. Genes con mayores cambios de expresión luego del daño en la médula espinal.

Gen	Nombre Gene	Módulo	Transectado VS Sham	Transectado VS Sin daño	Sham VS Sin daño
timp-1.L	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 1	I2	116.79	80.17	-8.10
lep.L	Leptin	I2	113.83	96.57	-1.98
aqp3.S	Aquaporin 3	L1	112.09	82.27	-3.25
crlf1.L	Cytokine Receptor Like Factor 1	L1	105.29	68.95	-8.57
itgb6.L	Integrin Subunit Beta 6	I2	102.42	81.22	1.12
ccl34.S	chemokine (C-C motif) ligand 34	I2	99.22	73.62	-9.72
s1pr5.L	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 5	I2	95.26	64.71	-7.71
cnn1.L	Calponin 1	I2	92.27	87.20	12.06
mgc69520.S	Novel 7 transmembrane receptor protein	I2	89.57	66.79	8.72
cnn1.S	Calponin 1	I2	87.84	83.20	18.72
loc100498463.S	Hypothetical protein LOC100498463	I2	83.81	63.11	-9.61
lima1.L	LIM Domain And Actin Binding 1	I2	78.29	69.22	-10.94
tnfrsf12a	TNF Receptor Superfamily Member 12A	I2	76.05	61.04	-11.31
manf.L	Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor	I2	72.79	64.43	22.34
manf.S	Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor	L1	66.57	60.65	18.63
pdia6.L	Protein Disulfide Isomerase Family A Member 6	L1	65.07	61.01	20.99
atf3.L	Activating Transcription Factor 3	E2	61.48	61.45	-8.89
polr1b.L	RNA Polymerase I Subunit B	I2	60.30	64.04	18.33

4.2 Realización de análisis bioinformáticos para identificar posibles genes o vías de señalización involucrados en la regeneración de la médula espinal y validar sus cambios mediante técnicas de biología molecular.

4.2.1 Análisis modular de los GDEs luego de la lesión

Para entender como está estructurada a nivel modular la red transcripcional desplegada en las primeras horas luego de una lesión en la medula espinal de renacuajos, se realizó un análisis de redes de co-expresión génica ponderada (*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*, WGCNA). Este corresponde a un poderoso método estadístico ampliamente utilizado en datos de transcriptómica [Chandran et al., 2016, Lin et al., 2018, Maertens et al., 2018]. WGCNA fue aplicado en 44 librerías de RNA-seq, correspondientes a los experimentos de series de tiempo de la condición transectado, incluidos los tiempos 0 horas de estas series. Se construyó una red de co-expresión del tipo *signed hybrid*, pudiendo identificar 11 módulos de co-expresión, los cuales agrupan a 1.708 de los 1850 genes diferencialmente expresados. En la **Figura 12** podemos observar una visualización de esta red de co-expresión, en esta el tamaño de los nodos es proporcional al valor BIC en la comparación transectado contra sham, la intensidad del nodo proporcional al número de conexiones que posee y el grosor de los puentes entre nodos representa la intensidad de la conexión entre ambos. También es importante mencionar que la cercanía física entre los módulos refleja una cercanía a nivel temporal durante su activación.

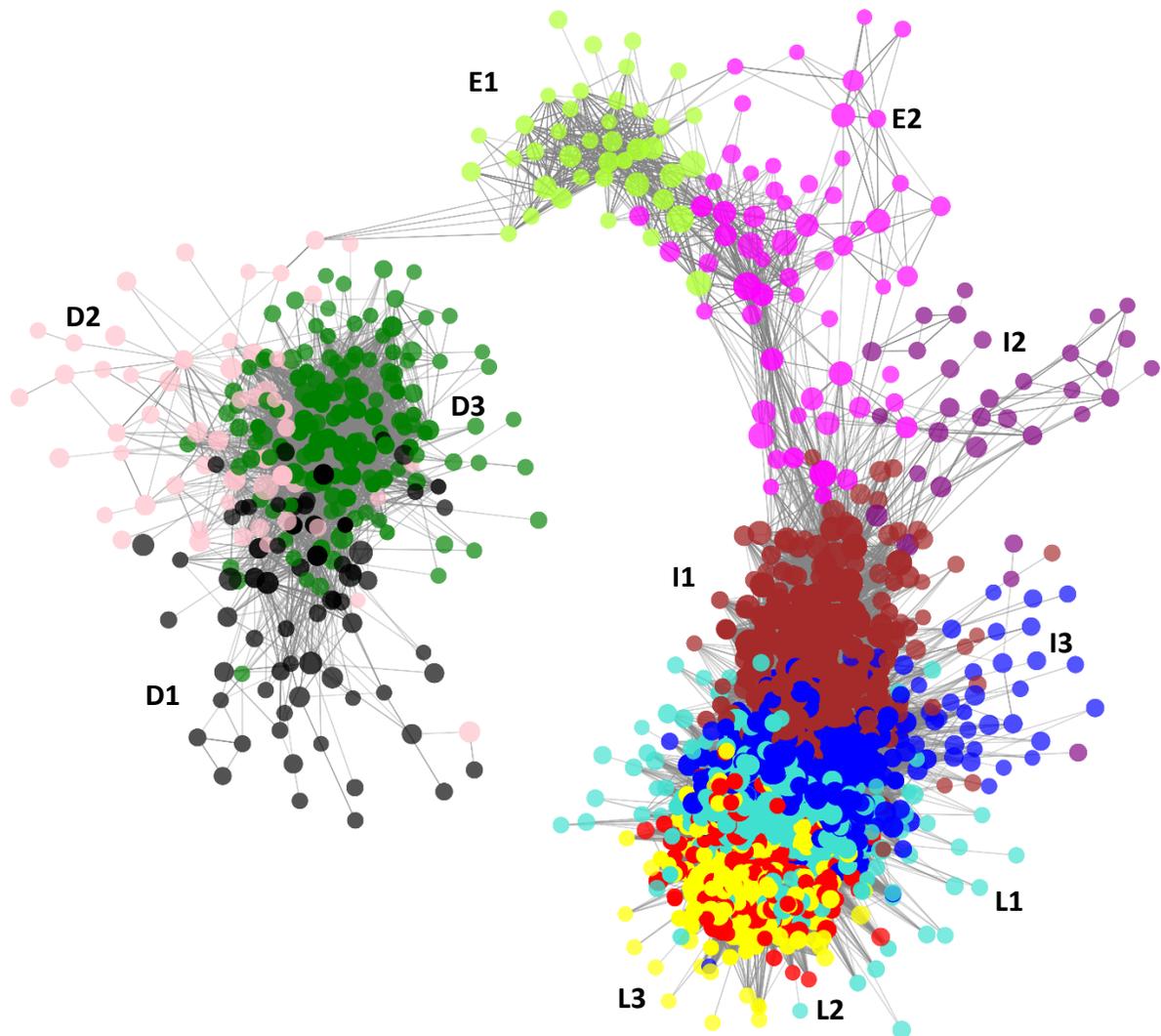


Figura 12. Red de co-expresión génica construida con WGCNA. Visualización de red de los 11 módulos de co-expresión identificados en el análisis, D1 (■), D2 (■), D3 (■), E1 (■), E2 (■), I1 (■), I2 (■), I3 (■), L1 (■), L2 (■) y L3 (■). El tamaño de los nodos es proporcional a valor de expresión diferencial (transectado-vs-sham) y la intensidad de este al número de conexiones que posee. Por otra parte la intensidad de color de las conexiones es proporcional a la fuerza de la interacción entre los dos nodos.

Basados en la correlación de la expresión génica respecto al tiempo y la máxima expresión en la ventana de tiempo estudiada, se identificaron 3 módulos regulados negativamente respecto al tiempo, D1, D2 y D3, y otros 8 módulos regulados positivamente respecto al tiempo. Estos últimos pueden ser sub-agrupados en tempranos (E1, E2), intermedios (I1, I2 e I3) y tardíos (L1, L2 y L3) según a que tiempo alcancen sus máximos niveles de expresión. Además, se observa una activación transitoria para los módulos E1, E2 e I2, a diferencia de los otros módulos regulados positivamente, los cuales mostraron una activación sostenida en el tiempo. Los perfiles de expresión temporal y los 10 genes con mayores cambios de expresión para los módulos son informados en las **Figuras 13, 14, 15 y 16**. Además los perfiles de expresión individuales para los 10 genes con mayores cambios de expresión diferencial para cada módulo son ilustrados en el **Apéndice 4**. Por otra parte, el módulo asignado y los valores de asociación a estos para los 1.850 GDE son informados en <https://drive.google.com/file/d/1napSKJKZ1YUG-XJJP5jQR27K-1iEbOsy/view>

Respecto al número de genes que compone los módulos positivamente regulados, observamos un incremento de este valor con el tiempo, módulos tempranos (E1 y E2) tienen un promedio de 65,5 genes, en los módulos intermedios (I1, I2 e I3) 177 genes y en los tardíos (L1, L2, L3) 216,3 genes, sugiriendo un remodelamiento progresivo del transcriptoma luego del daño a la médula espinal. En el caso de los genes regulados negativamente no nos fue posible establecer una clara temporalidad, por ende no fue posible hacer un análisis similar.

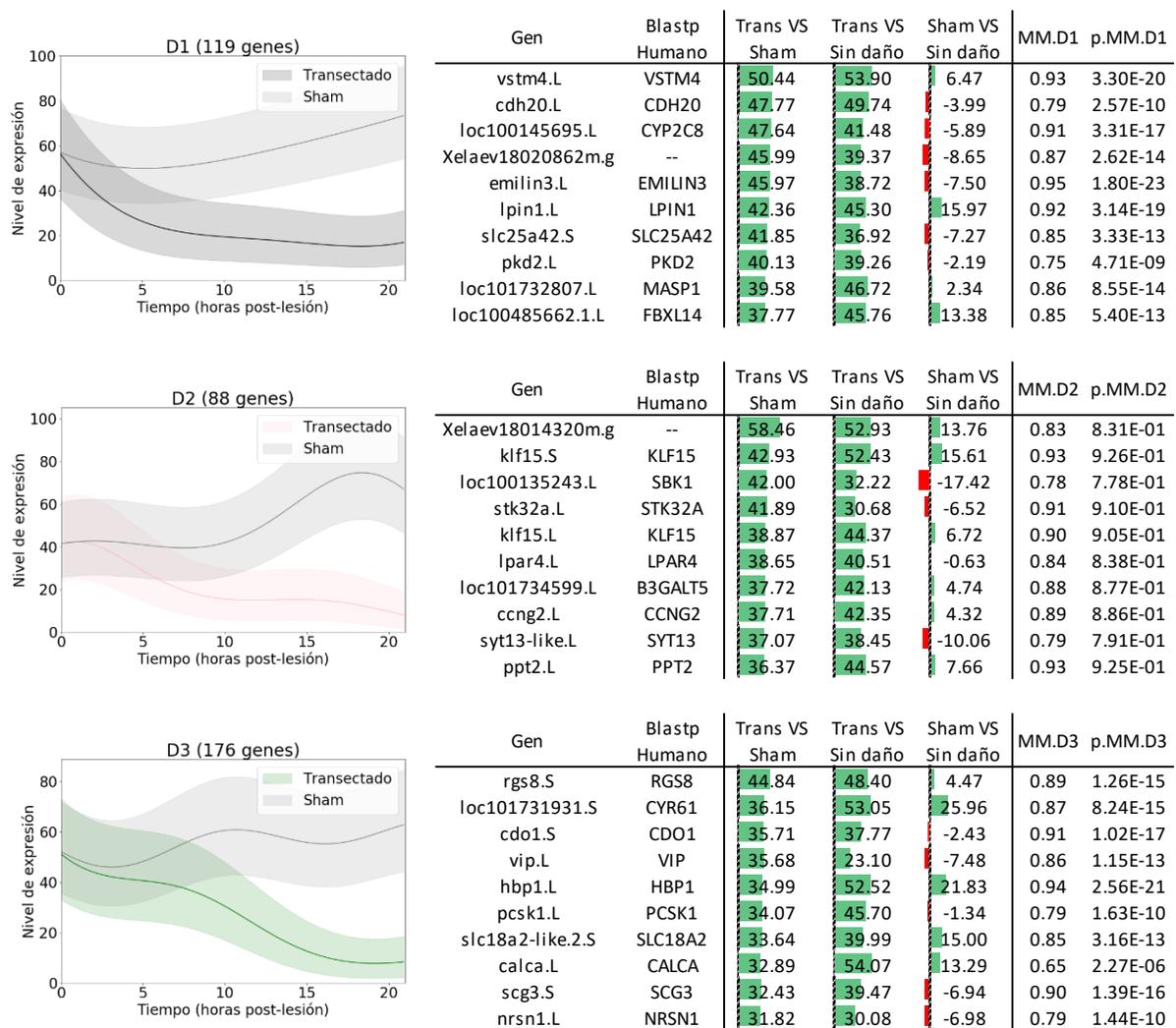


Figura 13. Módulos Regulados Negativamente. Modelamiento de los perfiles de expresión temporal para los módulos D1, D2 y D3. Estos son acompañados de tablas con los 10 genes de mayor expresión diferencial (transectado y sham) en el módulo. Para cada uno de estos genes se informa: el resultado de un análisis BlastP contra la base de datos de proteínas humanas (BlastP Human), valores de expresión para las tres comparaciones realizadas (Trans y Sham; Trans y Sin daño; Sham y Sin daño), correlación con el módulo asignado (Module Membership, MM) y significancia estadística de esta correlación (valor-p de MM, p.MM).

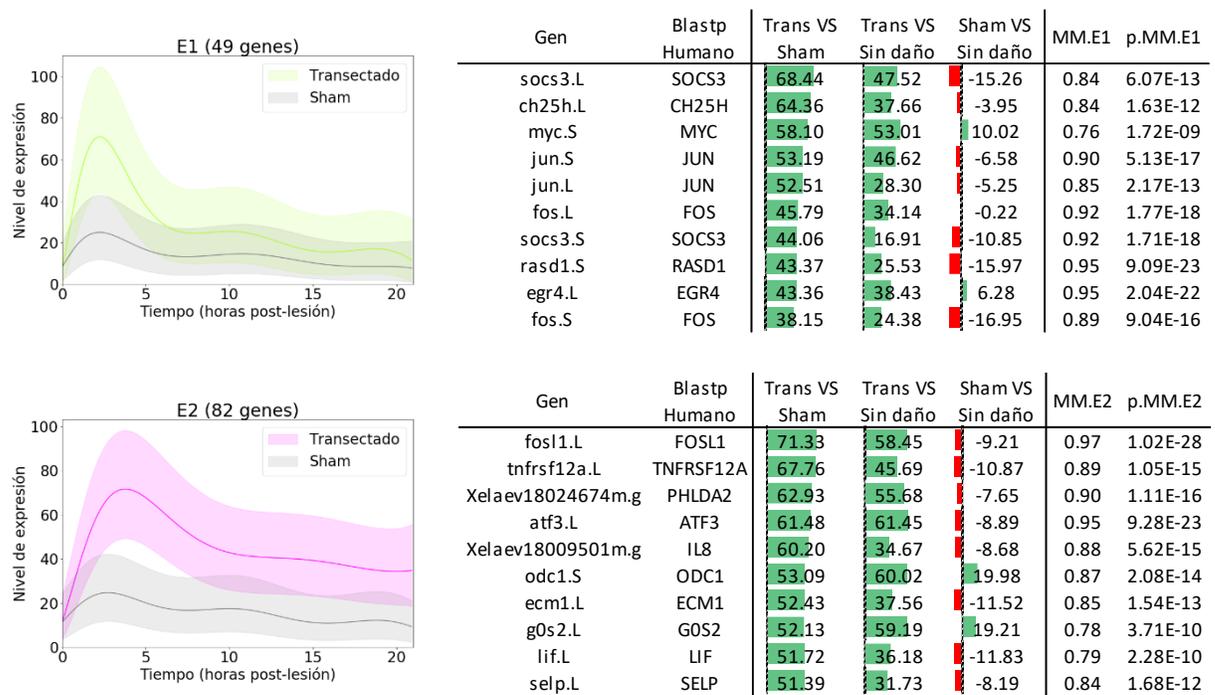


Figura 14. Módulos Tempranos Regulados Positivamente. Modelamiento de los perfiles de expresión temporal para los módulos E1 y E2. Estos son acompañados de tablas con los 10 genes de mayor expresión diferencial (transectado y sham) en el módulo. Para cada uno de estos genes se informa: el resultado de un análisis BlastP contra la base de datos de proteínas humanas (BlastP Human), valores de expresión para las tres comparaciones realizadas (Trans y Sham; Trans y Sin daño; Sham y Sin daño), correlación con el módulo asignado (Module Membership, MM) y significancia estadística de esta correlación (valor-p de MM, p.MM).

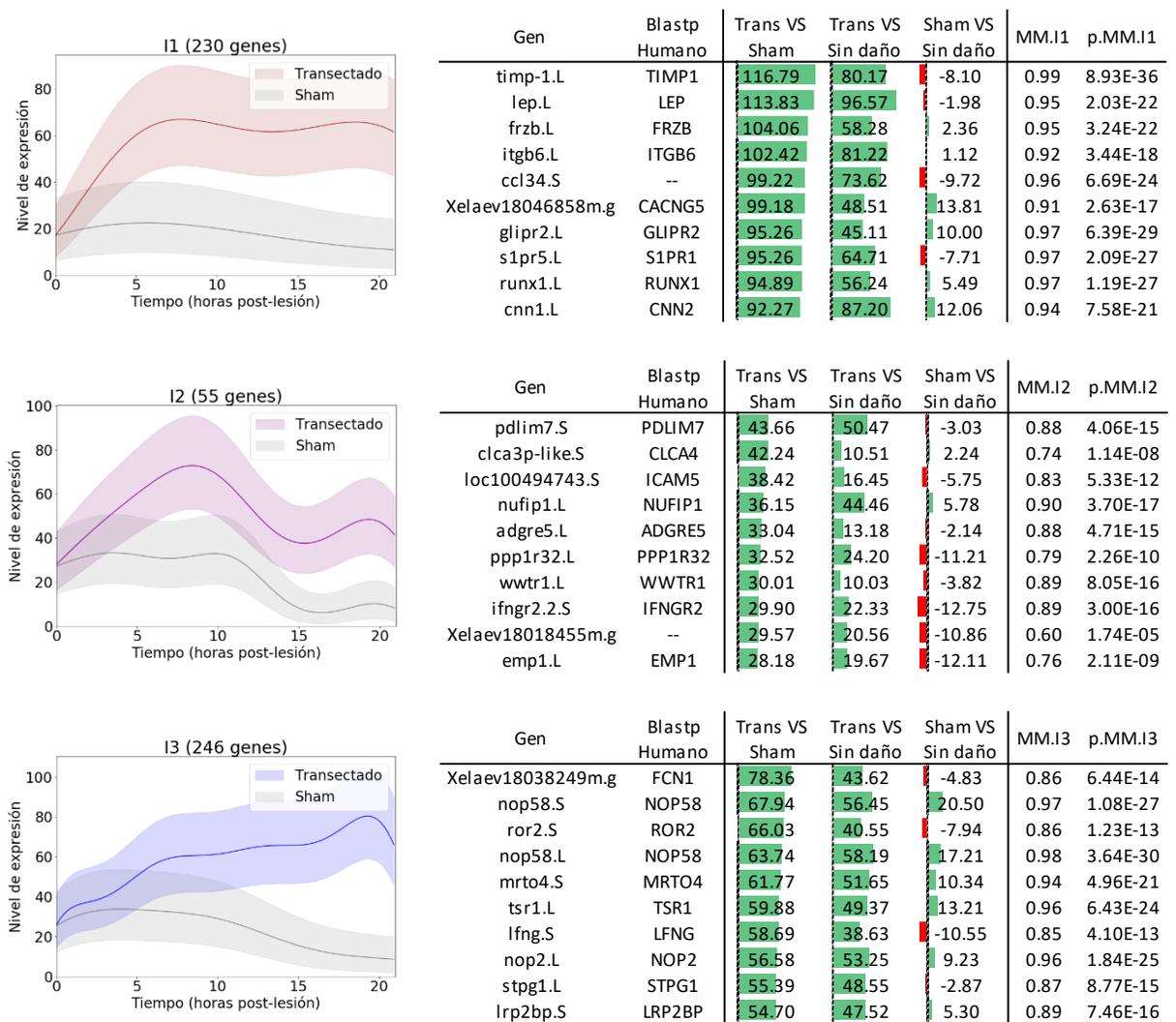


Figura 15. Módulos Intermedios Regulados Positivamente. Modelamiento de los perfiles de expresión temporal para los módulos I1, I2 e I3. Estos son acompañados de tablas con los 10 genes de mayor expresión diferencial (transectado y sham) en el módulo. Para cada uno de estos genes se informa: el resultado de un análisis BlastP contra la base de datos de proteínas humanas (BlastP Human), valores de expresión para las tres comparaciones realizadas (Trans y Sham; Trans y Sin daño; Sham y Sin daño), correlación con el módulo asignado (Module Membership, MM) y significancia estadística de esta correlación (valor-p de MM, p.MM).

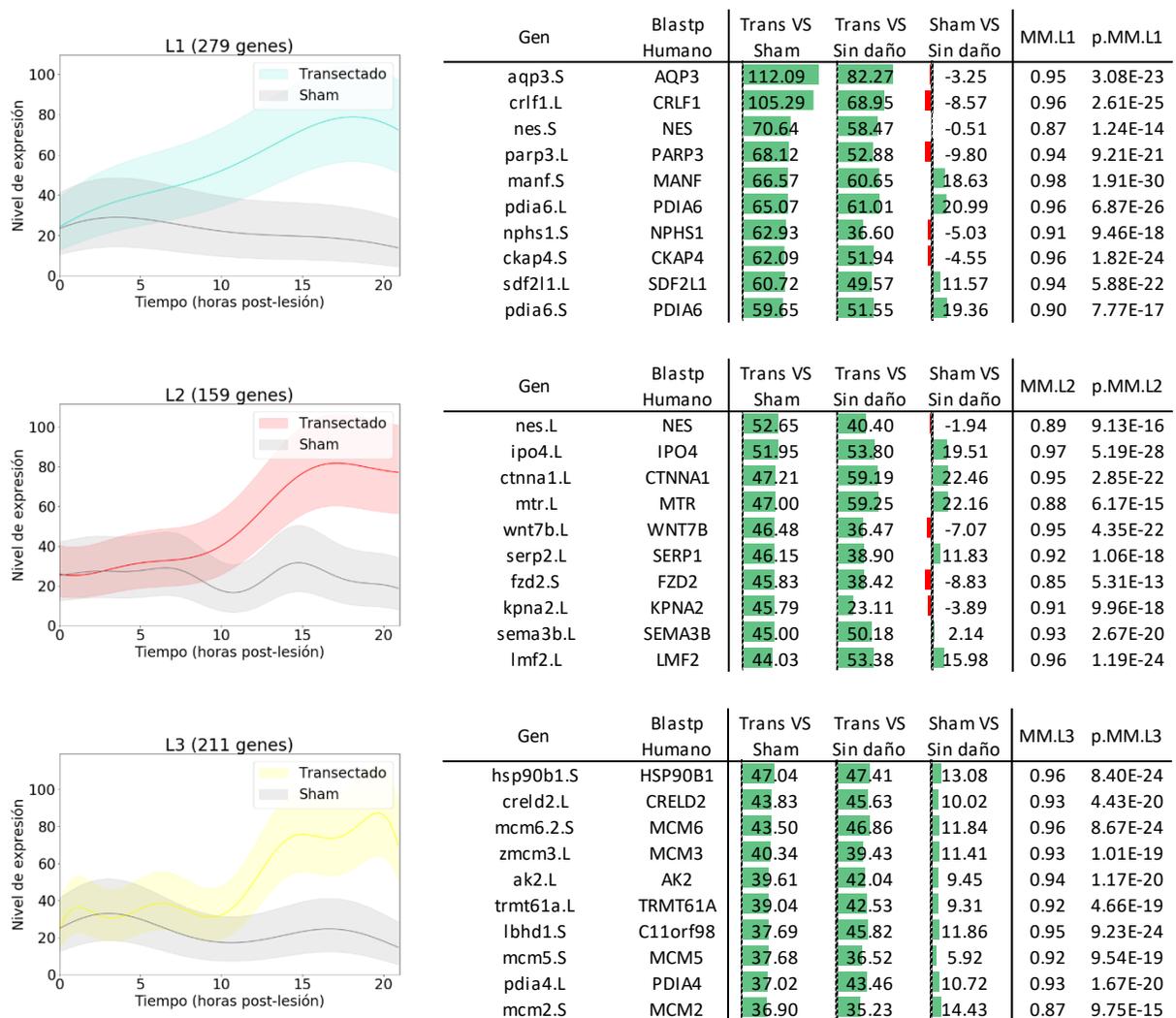


Figura 16. Módulos Tardíos Regulados Positivamente. Modelamiento de los perfiles de expresión temporal para los módulos L1, L2 y L3. Estos son acompañados de tablas con los 10 genes de mayor expresión diferencial (transectado y sham) en el módulo. Para cada uno de estos genes se informa: el resultado de un análisis BlastP contra la base de datos de proteínas humanas (BlastP Human), valores de expresión para las tres comparaciones realizadas (Trans y Sham; Trans y Sin daño; Sham y Sin daño), correlación con el módulo asignado (Module Membership, MM) y significancia estadística de esta correlación (valor-p de MM, p.MM).

También analizamos los valores de expresión diferencial para cada módulo, (**Tabla 7**), comprobando que no existe una gran variación entre el promedio del BIC de los genes que componen cada módulo en las comparaciones transectado y sin daño y sham y sin daño. Sin embargo, cuando comparamos los promedios de BIC para la comparación transectado y sham observamos un coeficiente de variación de un 26,4%. Al observar en detalle estos valores notamos que el módulo I1 tiene un valor promedio de BIC de 41,90 en esta comparación (transectado-vs-sham), siendo en promedio $41,75 \pm 10,05\%$ mayor que el resto de los módulos. Sugiriéndonos que los procesos biológicos más fuertemente desplegados en el inicio del proceso regenerativo de la médula espinal, estarían siendo regulados por los genes agrupados en este módulo de co-expresión.

Tabla 7. Comparación de expresión diferencial entre módulos. Promedios de expresión diferencial para los 11 módulos a través de las 3 comparaciones de expresión diferencial realizadas.

Módulo	Promedio de BIC Transectado VS Sham	Promedio de BIC Transectado VS Sin daño	Promedio de BIC Sham VS Sin daño
D1	22.98	30.64	2.72
D2	23.13	30.65	2.72
D3	17.50	29.16	3.10
E1	25.77	24.77	-6.83
E2	28.66	30.94	-2.80
I1	41.90	33.90	-4.08
I2	21.07	24.20	-1.99
I3	30.74	34.69	5.08
L1	27.98	32.19	2.00
L2	21.84	29.32	2.36
L3	19.64	28.85	5.53
Promedio	25.57 ± 6.75	29.94 ± 3.27	0.71 ± 4

4.2.2 Análisis de enriquecimiento de Ontología Génica y vías de señalización KEGG

Estudios previos han demostrado que genes co-expresados podrían estar implicados en funciones biológicas similares [Singer et al., 2004, McCarroll et al., 2004, van Dam et al.,

2017]. Basados en estos antecedentes, se analizó si los genes agrupados en los módulos de co-expresión identificados estaban enriquecidos en algún término ontológico de las categorías procesos biológico, función molecular o componente celular. Se hizo un análisis de enriquecimiento de ontología génica sobre los 11 módulos de co-expresión, pudiendo asociar términos ontológicos en todos ellos (valor-p \leq 0.01). Debido al alto número de términos asociadas a cada módulo, y la redundancia de estos, se realizó un agrupamiento basado en la similitud del término ontológico y de los genes asociados a cada uno de estos. En la **Fig. 17** se informa el término ontológico representativo de cada uno de estos agrupamientos en la categoría procesos biológicos, el cual fue seleccionado en base al producto entre $-\text{Log}$ del valor de significancia (valor-p) y la suma del BIC (transectado-vs-sham) de los genes en el término (**Detalles son explicados en Materiales y Metodologías, sección 3.2.4.7**). El detalle de los términos de ontología génica representativos para las categorías de procesos biológicos, función molecular y componente celular son informados en los **Apéndices 5-7**, mientras las visualizaciones de las categorías función molecular y componente celular con ilustradas en las **Figuras 18 y 19**, respectivamente.

Este análisis fue complementado con un análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) [Kanehisa y Goto, 2000], un resumen con las vías que consideramos más importantes para nuestra discusión es informado en la **Tabla 8**, mientras el análisis completo por módulo es informado en el Apéndice 8.

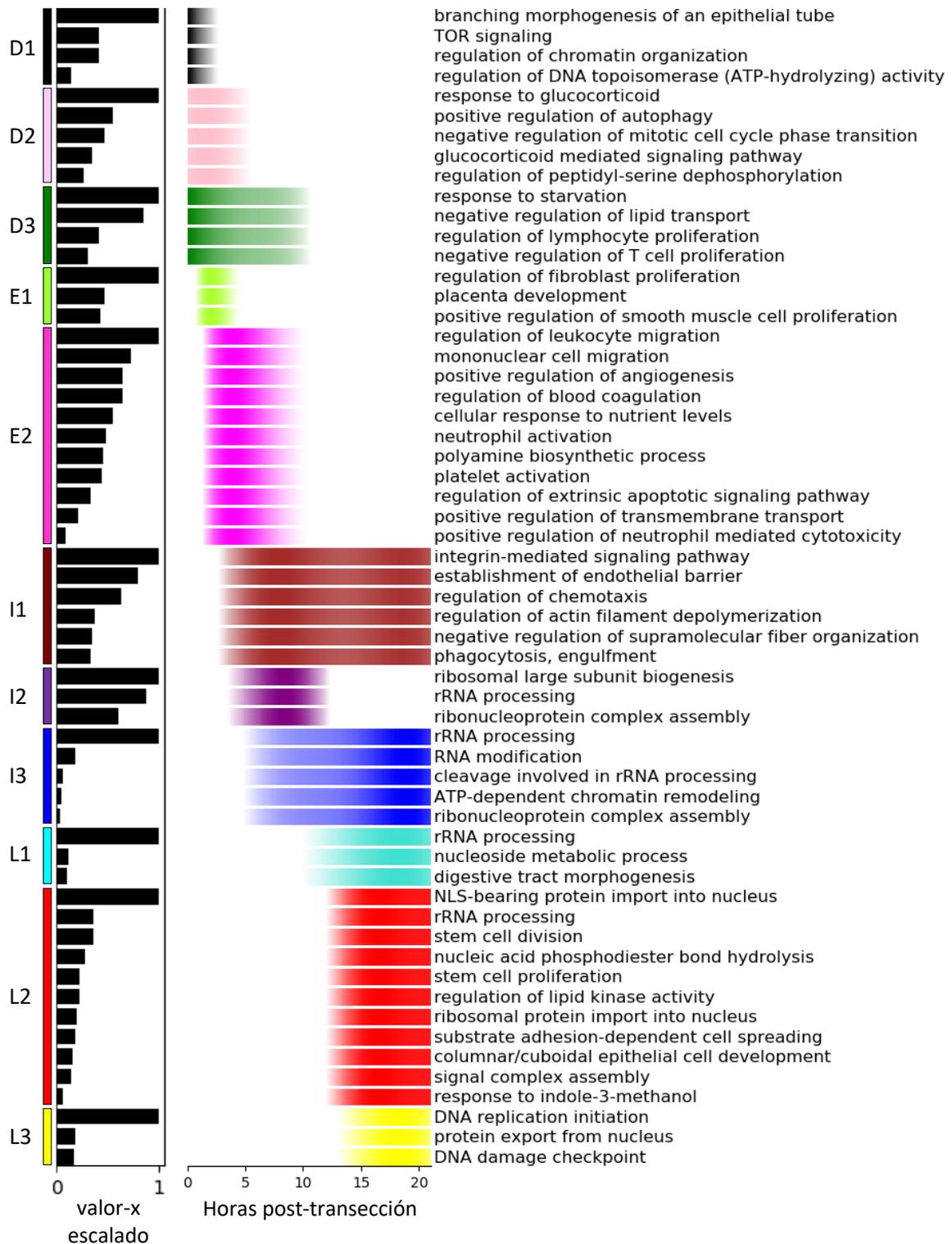


Figura 17. Procesos biológicos enriquecidos en los módulos de co-expresión identificados durante las primeras 21 horas luego del daño. Categorías representativas de los clústeres identificados en cada módulo luego del análisis de enriquecimiento de GO, acompañados del valor-x escalado por módulo.

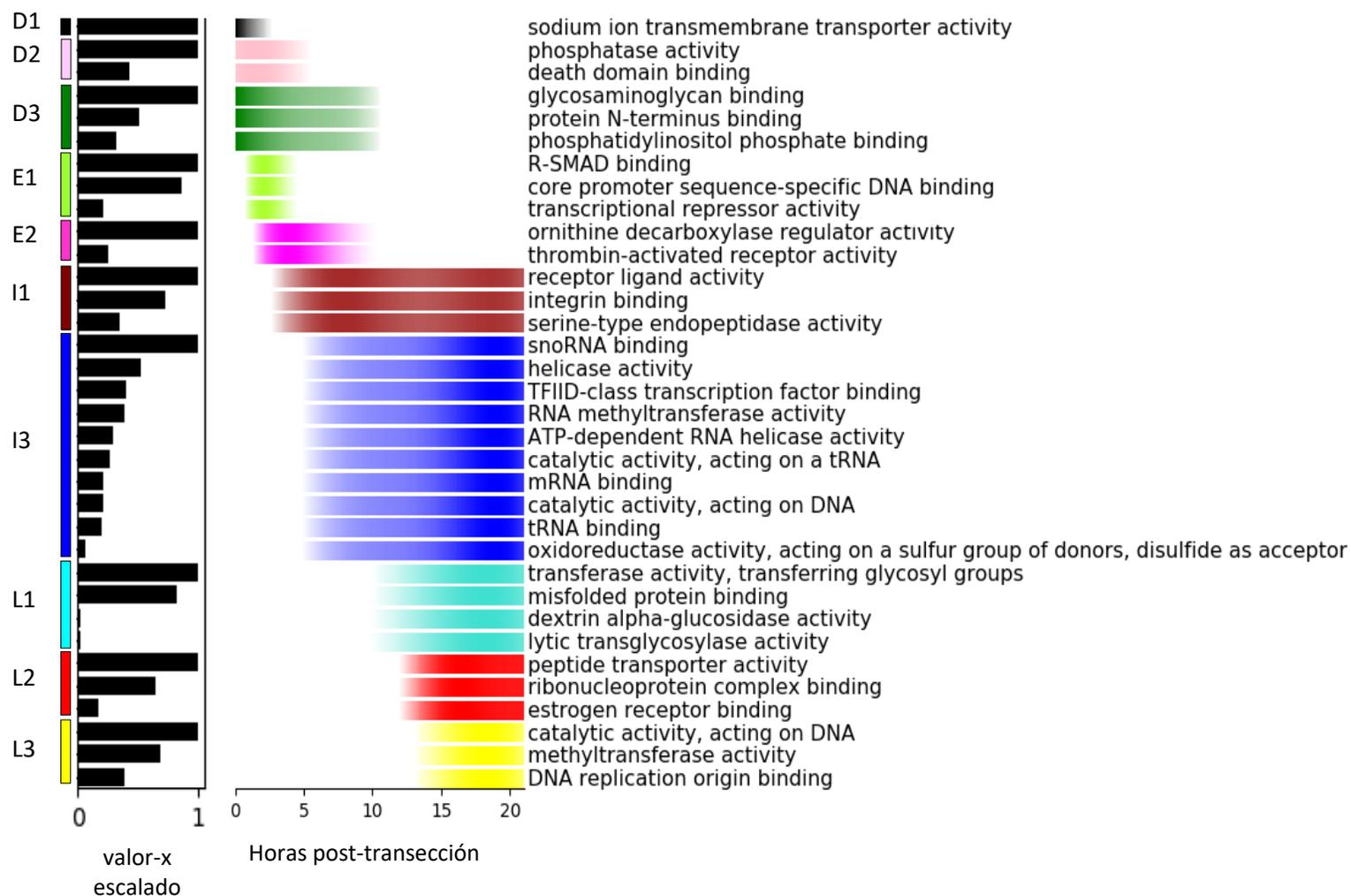


Figura 18. Funcionales Moleculares enriquecidas en los módulos de co-expresión identificados durante las primeras 21 horas luego del daño. Categorías representativas de los clústeres identificados en cada módulo luego del análisis de enriquecimiento de GO, acompañados del valor-x escalado por módulo.

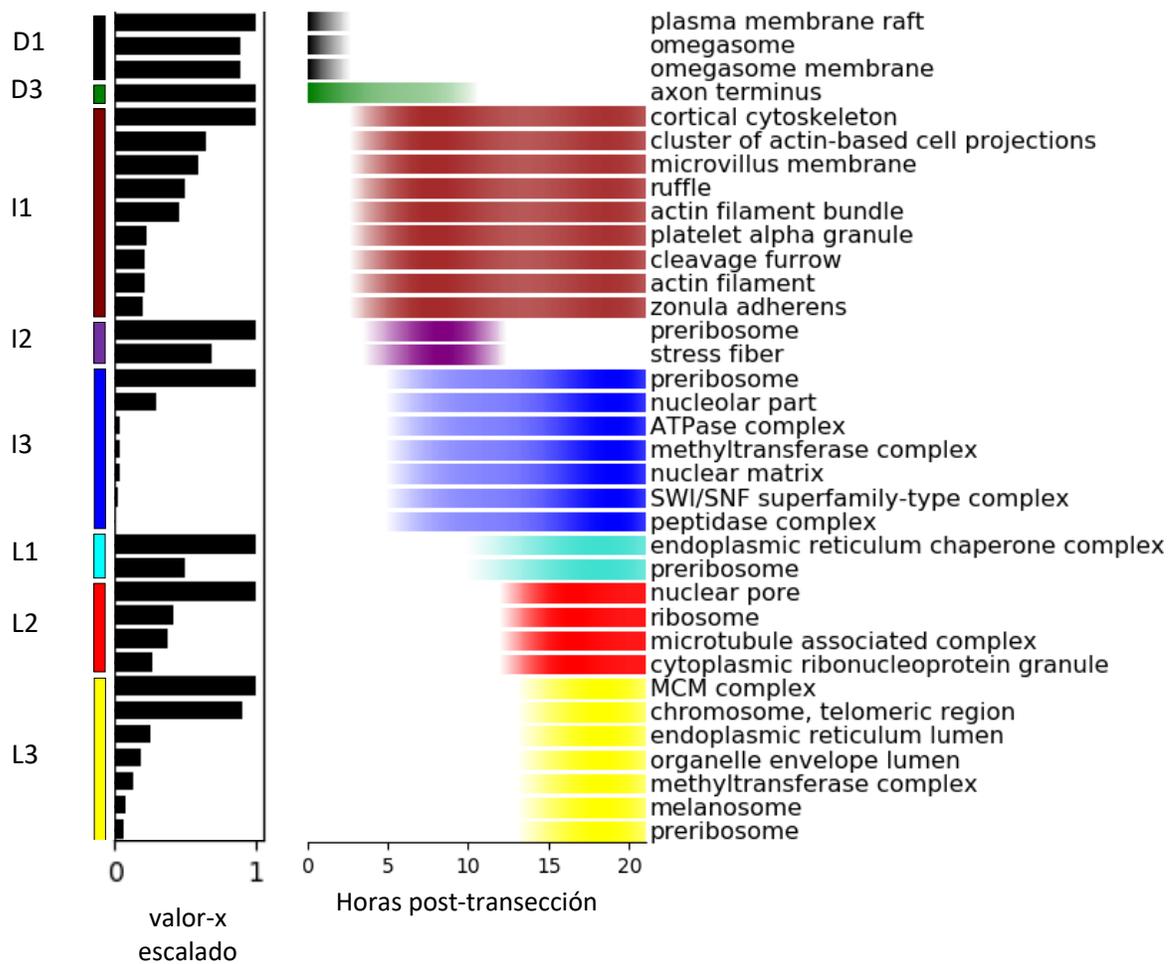


Figura 19. Componentes Celulares enriquecidos en los módulos de co-expresión identificados durante las primeras 21 horas luego del daño. Categorías representativas de los clústeres identificados en cada módulo luego del análisis de enriquecimiento de GO, acompañados del valor-x escalado por módulo.

Tabla 8. Resumen de vías de señalización KEGG identificadas

Module	ID Vía	Descripción	FDR	Genes
D1	hsa04150	mTOR signaling pathway	0.00	ULK1, ULK2, CASTOR2, LPIN1, DEPTOR, MAPKAP1, TSC2
E1	hsa04668	TNF signaling pathway	0.00	JUNB, VEGFC, JUN, PTGS2, FOS, NFKBIA, SOCS3
E1	hsa04010	MAPK signaling pathway	0.01	VEGFC, DUSP6, JUN, MYC, DUSP5, FOS
E2	hsa04668	TNF signaling pathway	0.04	LIF, BIRC2, IRF1, MAP3K14
I1	hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	0.01	TNFRSF12A, IL11RA, LIF, CCL19, CCL13, CCL3L1, IL1R2, LEP, TNFRSF21, INHBA, TNFRSF11B, TNFRSF6B, IL21R
I3	hsa03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	0.00	NOP56, GNL3, RIOK2, PWP2, RBM28, UTP4, BMS1, FBL, DKC1, UTP18, NOP58, TBL3
L1	hsa03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	0.00	WDR3, RIOK2, GAR1, UTP15, UTP4, HEATR1, POP1, UTP6
L1	hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.02	HYOU1, DNAJC3, HSP90B1, CKAP4, EDEM1, PDIA6, DERL1, SEC24C, SEL1L
L2	hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.01	TRAM1, SEC24B, UBE2G1, RPN1, UGGT1, STT3B, HSPA8, ERN1
L2	hsa04360	Axon guidance	0.01	SRC, PIK3R2, SEMA3C, SEMA3B, FZD3, MYL12A, NTN1, PLXNB3
L2	hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.01	SMAD1, PIK3R2, WNT7B, FZD3, CTNNB1, FZD2, RIF1
L3	hsa03030	DNA replication	0.00	MCM7, MCM5, MCM2, FEN1, MCM3, MCM4, MCM6
L3	hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.00	MOGS, UGGT2, CALR, PDIA3, HSP90B1, CAPN1, SEC13, SSR3, PDIA4, DERL1, STT3A, HSPBP1
L3	hsa04110	Cell cycle	0.00	MCM7, ORC6, ORC1, MCM5, MCM2, MCM3, MCM4, E2F1, MCM6
L3	hsa03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	0.00	WDR36, NOB1, SNU13, XPO1, REXO2, EIF6

A continuación, abordaremos en detalle los términos de ontología génica y vías de señalización que pareciesen ser más relevantes dentro de nuestro análisis.

4.2.2.1 mTOR Signalling

Se identificó un enriquecimiento en genes asociados al proceso biológico *Regulación de la señalización de TOR* (GO:0032006) en el módulo D1. Este resultado fue reforzado con un enriquecimiento en 7 componentes de la vía de señalización mTOR (hsa04150) en este mismo módulo en el análisis de vías de señalización KEGG, así como de 22 componentes de esta vía entre el total de genes diferencialmente expresados (**Fig. 20**). Los ARNm que codifican para dos proteínas asociadas con la regulación negativa de esta vía de señalización (DEPTOR y TSC2) están siendo regulados de manera negativa, así como también el ARNm de MAPKAP1 (también llamada SIN1, agrupado en el módulo D1), la cual es parte del complejo mTORC2. También observamos una disminución en el mensajero de *lipin-1* (en el módulo D1), el cual está asociado a biosíntesis de lípidos y es regulado por mTORC1. De igual manera vimos cambios en genes asociados a autofagia, con una disminución en los ARNm de *ulk1*, *ulk2*, *pp2cb*, *atg4b*, *atg2b* (módulos D1, D1, D2, D3 y sin módulo asociado), sin embargo, el ARNm de *atg4c* esta aumentado (módulo L3). Por otra parte vemos un aumento en los ARNm para 3 homólogos de *ras* (*mras*, *nras*, *rras*), *ern1*, *pik3r2*, *pik3r3* y *rps6kb1* (agrupados en los módulos I1, L1, I1, L2, L2 y los últimos dos sin módulo asociado).

En cuanto a la regulación de esta vía de señalización, en módulos más tardíos observamos una activación positiva de algunos miembros de la vía de señalización WNT: *wnt5a* (homealelo S en I1 y homealelo L en el módulo L1), *wnt7b* (en el módulo L2), *wnt11* (en el módulo L3), *fzd2* (ambos homealelos en el módulo L2), *fzd3* (en el módulo L2), *fzd6* (en el

módulo I1). Según literatura se ha reportado que la vía WNT puede regular positivamente a la vía mTOR [Asem et al., 2016; Chen y Long, 2018]. También un mapeo de nuestros GDE a las vías de señalización KEGG reportaron la presencia de 41 componentes de la vía de señalización PI3K/Akt y 33 de la vía MAPK. Ambas han sido previamente relacionadas a la regulación de la vía mTOR, lo cual sumado a los componentes de vía WNT, nos sugerirían que la mTOR podría estar siendo regulada a múltiples niveles durante las etapas tempranas de la regeneración de la médula espinal. Los componentes diferencialmente expresados de las vías PI3K/Akt y MAPK son destacados en rosado en los mapas de las vías de señalización en el Apéndice 9.

Respecto a la función que podría estar desempeñando esta vía de señalización, y específicamente desde la rama de mTORC1, identificamos un aumento de la expresión del gen *rps6kb1* (sin asociación a módulos identificados), el cual codifica para una quinasa que fosforila directamente a la proteína ribosomal S6. Esta quinasa controla la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas [Chauvin et al., 2014]. Respecto a esta última función de la rama de mTORC1, se sabe que una de las maneras de regular la síntesis de proteína es también a través de complejo EIF4F [Gandin et al., 2016; Gandin et al., 2016; Merrick, 2015] complejo que está encargado de regular la traducción cap-dependiente mediante el reconocimiento de secuencias específicas en la región 5'UTR de determinados mensajeros [Gingras et al., 1999; Gingras et al., 1999]. Hemos observado que tres miembros de este complejo presentan un aumento en la expresión de sus mensajeros, *eif4e* (en el módulo I2), *eif4g3* (homealelos S y L en módulo L1) y *eif4a1* (homealelos S y L en módulo I3).

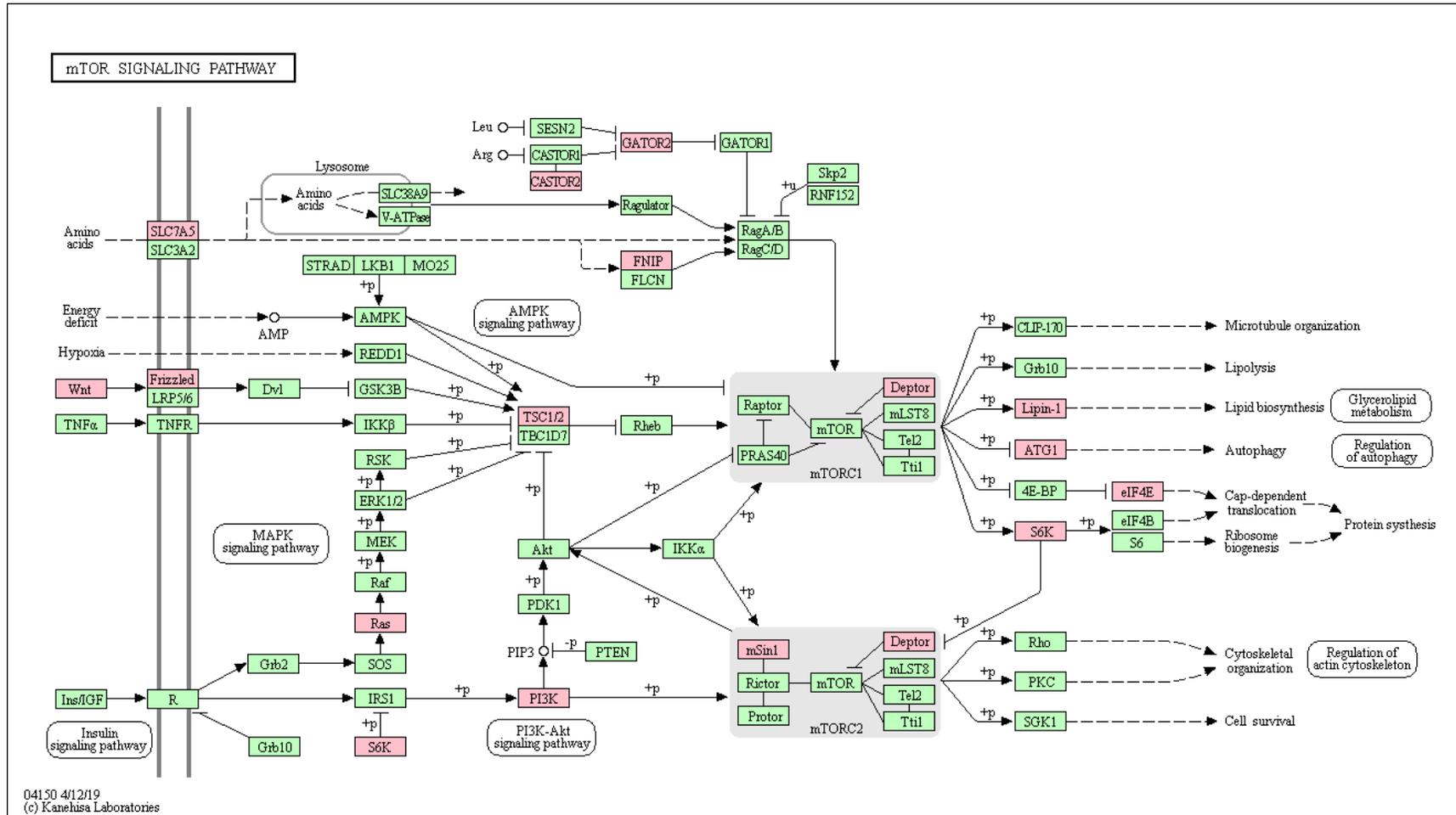


Figura 20. Esquema de la vía de señalización mTOR. En color rosado son destacados todos los componentes de esta vía de señalización, los cuales fueron identificados como diferencialmente expresados en nuestros análisis. Imagen extraída de <http://www.genoma.jp/kegg>, correspondiente al modelo de vía de señalización humana donde fueron mapeados nuestros datos.

4.2.2.2 Genes Temprano Inmediatos (GTIs, Módulo E1)

Observamos un alto número de factores de transcripción agrupados en el módulo E1, aproximadamente el 36,73% respecto al $6,53 \pm 3,79\%$ encontrado en promedio en el resto de los módulos. Esto pudo ser corroborado en un análisis de enriquecimiento de funciones moleculares (**Fig. 18**) donde observamos un enriquecimiento en este módulo para funciones como *R-SMAD binding* (GO:0070412), *Core promoter sequence-specific DNA binding* (GO:0001046) y *Transcriptional repressor activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding* (GO:0001227).

Además es importante destacar que el 48% de los genes asociados al módulo E1 han sido descrito en investigaciones previas como genes de expresión temprana inmediata, como por ejemplo: *ier2* (*immediate early response 2*) [Tullai et al., 2007; Neeb et al., 2012], *btg2* (*B-cell translocation gene 2* o también llamado *tis21*) [Lin et al., 1996], *arc* (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*) [Minatohara et al., 2015], *rasd1* (*Ras Related Dexamethasone Induced 1*) [Wang et al., 2017], *rhob* (*Ras homolog gene family, member B*) [Jähner et al., 1991] y *klf10* (*Kruppel like factor 10*) [Subramaniam et al., 2010]. A los genes de expresión temprana inmediata, tal como ya hemos mencionado previamente, se les atribuye la función de primeros respondedores en frente a una variedad de estímulos y serían los encargados de remodelar la maquinaria celular para responder frente a estos.

El análisis de vías de señalización KEGG arrojó un enriquecimiento en módulo E1 con 7 y 6 componentes de las vías de señalización del Factor de Necrosis Tumoral (TNF, hsa04668) y de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, hsa04010), respectivamente. Sin embargo, dentro de la ventana de estudio observamos cambios transcripcionales para 16 y 33

componentes de las vías TNF y MAPK respectivamente. En el Apéndice 9 se muestran ambas vías de señalización y son destacados con rosado los componentes que tienen cambios transcripcionales en nuestro estudio.

Respecto a ambas vías de señalización, el módulo E1 está enriquecido en varios blancos transcripcionales y efectores de la vía TNF, los factores de señalización intracelular negativa *nfkbia* y *socs3*, los factores de transcripción *fos*, *jun* y *junb*, el factor de crecimiento endotelial vascular *vegfc* y la prostaglandina-endoperóxido sintasa *ptgs2*. Del mismo modo, se encuentran sobre-expresados *lif* (Inflammatory cytokines) en los módulos E2 (homeoalelo L) e I1 (homeoalelo S) y *mfaip3* en el módulo I1, los cuales también corresponden a blancos transcripcionales de la vía TNF. Por otra parte, es conocida la función de la vía MAPK induciendo la expresión de GTIs [O'Donnell et al., 2012; Healy et al., 2013], por ende ambas vías podrían ser candidatas a inducir los genes del módulo E1.

4.2.2.3 Procesamiento de ARNs ribosomales

En los módulos I2, I3, L1 y L2 fue encontrado un enriquecimiento en el término GO de procesamiento de ARNs ribosomales (GO:0006364). En estos módulos encontramos 35 factores de biogénesis ribosomal, los cuales han sido asociados previamente al correcto mantenimiento de células troncales (Brombin et al., 2015). Entre estos, encontramos factores asociados a varias etapas de la biogénesis ribosomal:

(1) Transcripción de ARNs ribosomales (*polr1b*, agrupado en el módulo I1)

(2) Procesamiento de pre-ribosoma 90S

- 2'-O-methylation of rRNA: *fbl* (perteneciente al módulo I3)

- Pseudouridylation of rRNA: *dkc1* (agrupado en el módulo I3)
- Primary Assembly Steps: *wdr43* (perteneciente al módulo I1), *dhx37*, *pwp2*, *tbl3*, *utp18* (los 4 agrupados en el módulo I3), *heatr1* (perteneciente al módulo L1), *nol11* (homeolalelos S y L agrupados en módulos L2 y L3 respetivamente) y *wdr46* (del módulo L2)
- Secondary Assembly Steps: *bms1* (I3)
- Tertiary assembly steps: *ipo4*, *utp20* (ambos agrupados en el módulo L2);

(3) Maturation and export of pre-40S particles: *nom1* (perteneciente al módulo I2), *rrp12*, *tsr1* (ambos agrupados en el módulo I3), *noc4l*, *wdr3* (ambos agrupados en el módulo L1);

(4) Maturation and export of pre-60S particles: *noc3l* (perteneciente al módulo I1), *noc2l*, *ddx54*, *ppan* (los tres agrupados en el módulo I2), *bop1*, *brix1*, *rbm28*, *rpf2*, *rrp1*, *sdad1*, *cebpz* (los 6 pertenecientes al módulo I3), *ddx56* (homeolalelos S y L agrupados en módulos I1 y L1 respetivamente), *wdr12* (perteneciente al módulo L1)).

Estos resultados también fueron reforzados con un enriquecimiento en miembros de la vía de señalización de biogénesis de ribosomas en eucariontes (hsa03008) en los módulos I3, L1 y L3.

4.2.2.4 Regulación de la pluripotencia de células progenitoras

El análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG arrojó un enriquecimiento en componentes de la vía de señalización de regulación de pluripotencia en células troncales (hsa04550) en el módulo L2. En este módulo se identificaron 7 componentes de la vía de señalización, mientras son 20 los diferencialmente expresados en la ventana de tiempo estudiada. Los componentes encontrados en el módulo L2 son también parte de las vías de

señalización Wnt (*wnt7b*, *fzd2*, *fzd3* y *ctnmb1*) y TGF- β , que si bien en este módulo solo se observa la presencia de *smad1* en total son 13 los componentes de esta vía de señalización que están diferencialmente expresados. También se observa un aumento en el ARNm de *lif*, otro ligando de esta vía de la vía de regulación de pluripotencia, en los módulos E2 e I1 para los homeoalelos L y S respectivamente. Esta información se ve reforzada por un enriquecimiento en los términos de ontología génica *Stem Cell Division* (GO:0017145) y *Stem Cell Proliferation* (GO:0072089) para el mismo módulo.

Además, en el módulo L2 es posible encontrar un enriquecimiento de genes asociados al proceso biológico *columnar/cuboidal epithelial cell development* (GO:0002066), el cual corresponde al tipo de morfología epitelial presente en el canal central de la médula espinal, región específica donde se alojan los progenitores neurales en este tejido.

4.2.2.5 Replicación de ADN y ciclo celular

En el módulo L3 encontramos un enriquecimiento es genes asociados al proceso biológico *DNA replication initiation* (GO:0006270). Este resultado, es también reforzado con un enriquecimiento en miembros de las vías de señalización *DNA replication* (hsa03030) y *Cell cycle* (hsa04110) en el mismo módulo.

4.2.3 Análisis de enriquecimiento de sitios de unión al ADN

Para identificar alguna relación entre la activación transcripcional de factores de transcripción y su posible rol en la regulación de los módulos de co-expresión identificados, realizamos un análisis de enriquecimiento de secuencias de sitios de unión al ADN en los promotores proximales de los genes agrupados en cada módulo (**Detalles en Materiales y Metodologías, sección 3.2.4.9**).

Identificamos que las secuencias de los sitios de unión al ADN de 5 factores de transcripción del módulo E1 (bhlhe40, egr1, egr4, hes1, myc) presentaban un enriquecimiento en los promotores proximales de los módulos I3 (bhlhe40, egr1, egr4, hes1), D3 (egr1), L1 (bhlhe40, egr1, hes1, myc), L2 (hes1) y L3 (bhlhe40, hes1, myc). Los promotores de los módulos de co-expresión D3, L1 y L3 presentaron un enriquecimiento en la secuencia del sitio de unión al ADN de klf9, un factor de transcripción agrupado en el módulo D2. Los factores de transcripción smad3 y etv6 del módulo I1 mostraron un enriquecimiento de las secuencias de sus sitios de unión al ADN en los promotores de los módulos I3 (smad3, etv6), L1 (smad3) y L3 (smad3). Los promotores de los módulos I3, L1 y L3 mostraron un enriquecimiento en las secuencias de los sitios de unión al ADN del factor de transcripción max, perteneciente al módulo D3. Finalmente, los promotores del módulo L3 presentaron un enriquecimiento en las secuencias del sitio de unión al ADN para e2f1 un factor de transcripción perteneciente al mismo módulo. El resumen de estos enriquecimientos y de la construcción de una posible red genética se ilustra en la **Fig. 21**.

4.2.4 Construcción de red de interacción proteína-proteína

Con el objetivo de conocer cuál era el grado de interacción que existía entre las proteínas codificadas por los genes identificados en nuestros análisis de transcriptómica, decidimos realizar una red de interacción proteína-proteína basada en la base de datos BioGRID v3.4.151.

En la **Fig. 22** se puede observar la red de interacción resultante de nuestro análisis, la cual está conformada por 951 nodos (proteínas) y es altamente compactada, lo que sugeriría un alto grado de interacción entre las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados. La red tiene en promedio 8,86 interacciones por nodo, y contrario a lo que podríamos haber pensado tanto factores de transcripción como proteínas sin función transcripcional tienen un promedio similar de interacciones, 9,00 y 8,86 respectivamente. En la **Tabla 9** se presentan las 20 proteínas con el mayor grado de conexión en la red, donde solo encontramos un factor de transcripción, que corresponde a MYC.

También, realizamos una red de interacción proteína-proteína solo con los factores de transcripción diferencialmente expresados (**Fig. 23**), esto con el objetivo de identificar a aquellos que podían estar participando en un mayor número de complejos transcripcionales. Los tres factores de transcripción con el mayor número de interacciones fueron SMAD3, JUN y MYC, con 12, 10 y 9 interacciones respectivamente. Además, estos tres FT tienen un alto nivel de expresión diferencial con un BIC > 45 en todos los casos. El detalle de 20 FT más conectados en la red puede ser revisado en la **Tabla 10**.

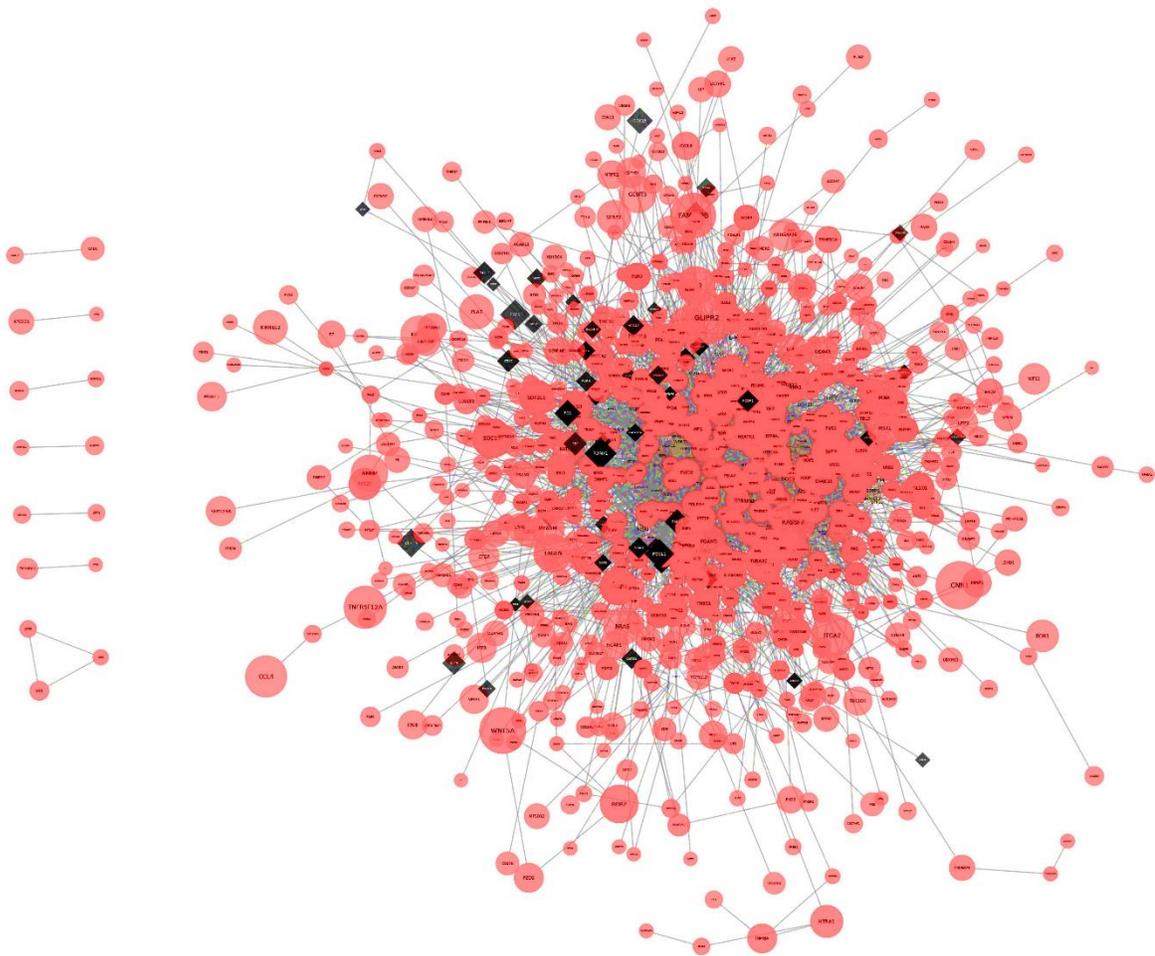


Figura 22. Red de interacción proteína-proteína entre genes diferencialmente expresados. Se visualizan todas las interacciones reportadas experimentalmente por la base de datos BioGRID para las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados en nuestro análisis. En la imagen el tamaño de los nodos es proporcional al valor de expresión diferencial, mientras la intensidad del nodo al número de conexiones que este tiene.

Tabla 9. Proteínas con mayor grado de interacciones dentro de la red total

Proteína	Módulo	Grados de conexión	Factor de Transcripción	BIC, TransVSSham
EED	L1	218	✘	18.39
ELAVL1	I3	179	✘	19.78
XPO1	L3	165	✘	15.60
MCM2	L3	110	✘	36.90
CDK2	L3	84	✘	15.50
NOP56	I3	78	✘	44.93
MYC	E1	76	✔	58.10
HSPA5	I3, L1	65	✘	38.82
HDAC1	I3	65	✘	40.43
FBL	I3	64	✘	43.91
NOP2	I3	59	✘	56.58
NOP58	I3	56	✘	67.94
RPA2	L3	52	✘	11.21
HDAC5	D1	51	✘	34.58
HSPA8	L2	50	✘	20.42
TAT	NA	48	✘	22.14
SYNCRIP	I3	46	✘	37.62
NHP2L1	L3	46	✘	17.20
NIFK	I3	43	✘	37.99
CTNNB1	L1, L2	42	✘	10.16

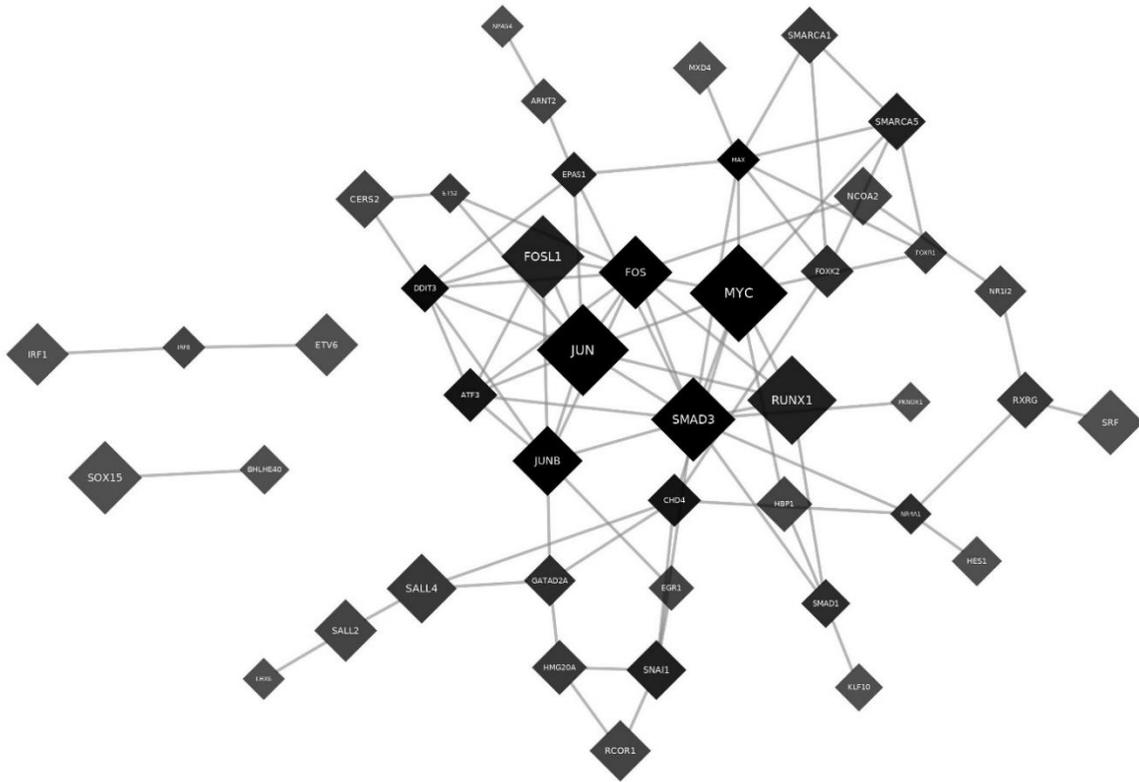


Figura 23. Red de interacción proteína-proteína entre genes diferencialmente expresados. Se visualizan todas las interacciones reportadas experimentalmente por la base de datos BioGRID para los factores de transcripción codificados por los genes diferencialmente expresados en nuestro análisis. En la imagen el tamaño de los nodos es proporcional al valor de expresión diferencial, mientras la intensidad del nodo al número de conexiones que este tiene.

Tabla 10. Proteínas con mayor grado de interacciones dentro de la red de factores de transcripción

Proteína	Módulo	Grados de conexión	Factor de Transcripción	BIC, TransVSSham
SMAD3	L1	12	✓	46.94
JUN	E1	10	✓	53.19
MYC	E1	9	✓	58.10
MAX	D3	8	✓	13.10
JUNB	E1	8	✓	35.20
FOS	E1	8	✓	38.15
DDIT3	E2	7	✓	17.42
CHD4	L1	6	✓	21.43
ATF3	E1	6	✓	22.09
SNAI1	I2	5	✓	26.82
EPAS1	D3	5	✓	15.27
FOSL1	E2	5	✓	45.88
RUNX1	L1	5	✓	51.07
SMARCA5	I3	5	✓	25.10
FOXK2	D3	4	✓	21.28
GATAD2A	L1	4	✓	20.16
SMAD1	L2	4	✓	17.95
NR4A1	NA	4	✓	11.57
HMG20A	D3	3	✓	22.88
FOXR1	D3	3	✓	13.20

4.2.5 Validación de genes y/o vías de señalización.

Como resultados de nuestros análisis bioinformáticos procedimos a validar la activación de 9 genes y una vía de señalización que podían estar implicados en el inicio del proceso regenerativo de la médula espinal.

Mediante RT-qPCR evaluamos la expresión de los genes *fos*, *socs3*, *fosl1*, *smad3*, *inhba*, *runx1* y *asmb1_27531* (**Fig. 24-30**). Identificando al menos un punto temporal diferencialmente expresado en todos ellos, excepto en *fosl1* y *asmb1_27531*, los cuales si bien no presentan expresión diferencial, muestra una cinética similar a la detectada en el RNA-seq. Por otra parte, validamos los niveles de p-Jun por IFI (**Fig. 31**), observando un aumento en sus niveles a 12 y 21 horas en núcleos alejados al canal central, lo cual nos sugiere que este factor de transcripción es activado durante el primer día en células neuronales, y su activación es drásticamente disminuída al día 2. Finalmente, validamos la activación de la vía mTOR, y específicamente la rama de mTORC1 midiendo los niveles de pS6 (blanco directo de la vía) por WB, y observamos una rápida activación a las 3 horas, la cual es mantenida a lo largo del día 1 (Trabajo de Claudia Parra, **Apéndice 10**).

Una vez finalizadas estas pruebas de validación, decidimos continuar con pruebas de funcionalidad biológica para Smad3 y la vía de señalización mTORC1. Las razones específicas de esta elección serán descritas en las siguientes secciones.

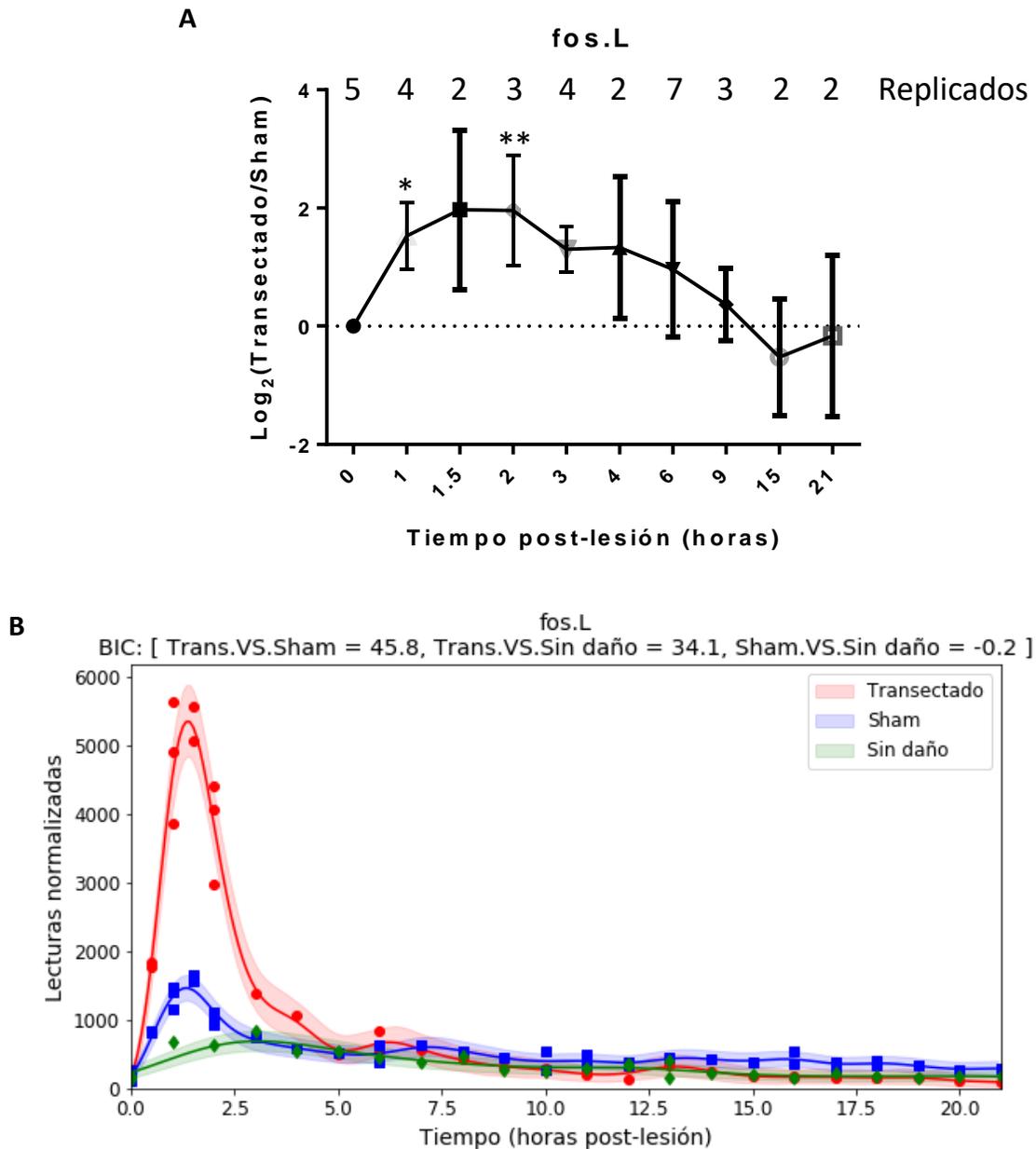


Figura 24. Validación de la expresión del gen *fos*. A. Gráfico de la expresión del gen *fos* evaluada mediante qPCR, se informa el Log₂ de la razón entre la condición transectado y sham (*: valor-p ≤ 0,05; **: valor-P ≤ 0,01). B. Modelamiento mediante Procesos Gaussianos de la expresión del gen *fos* en ensayos de transcriptómica.

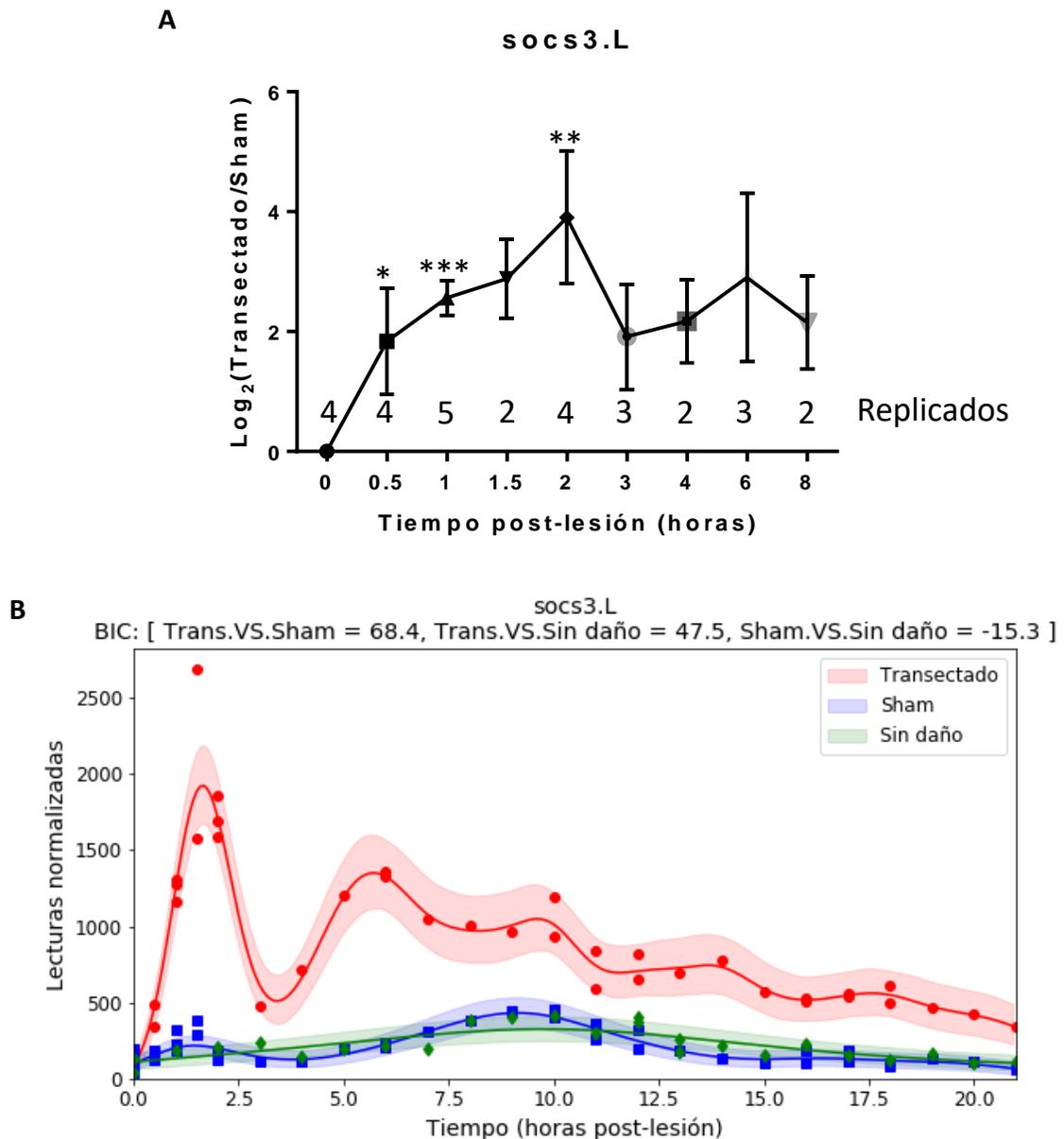


Figura 25. Validación de la expresión del gen *socs3*. A. Gráfico de la expresión del gen *socs3* evaluada mediante qPCR, se informa el Log₂ de la razón entre la condición transectado y sham (*: valor-p ≤ 0,05; **: valor-P ≤ 0,01; ***: valor-P ≤ 0,001). B. Modelamiento mediante Procesos Gaussianos de la expresión del gen *socs3* en ensayos de transcriptómica.

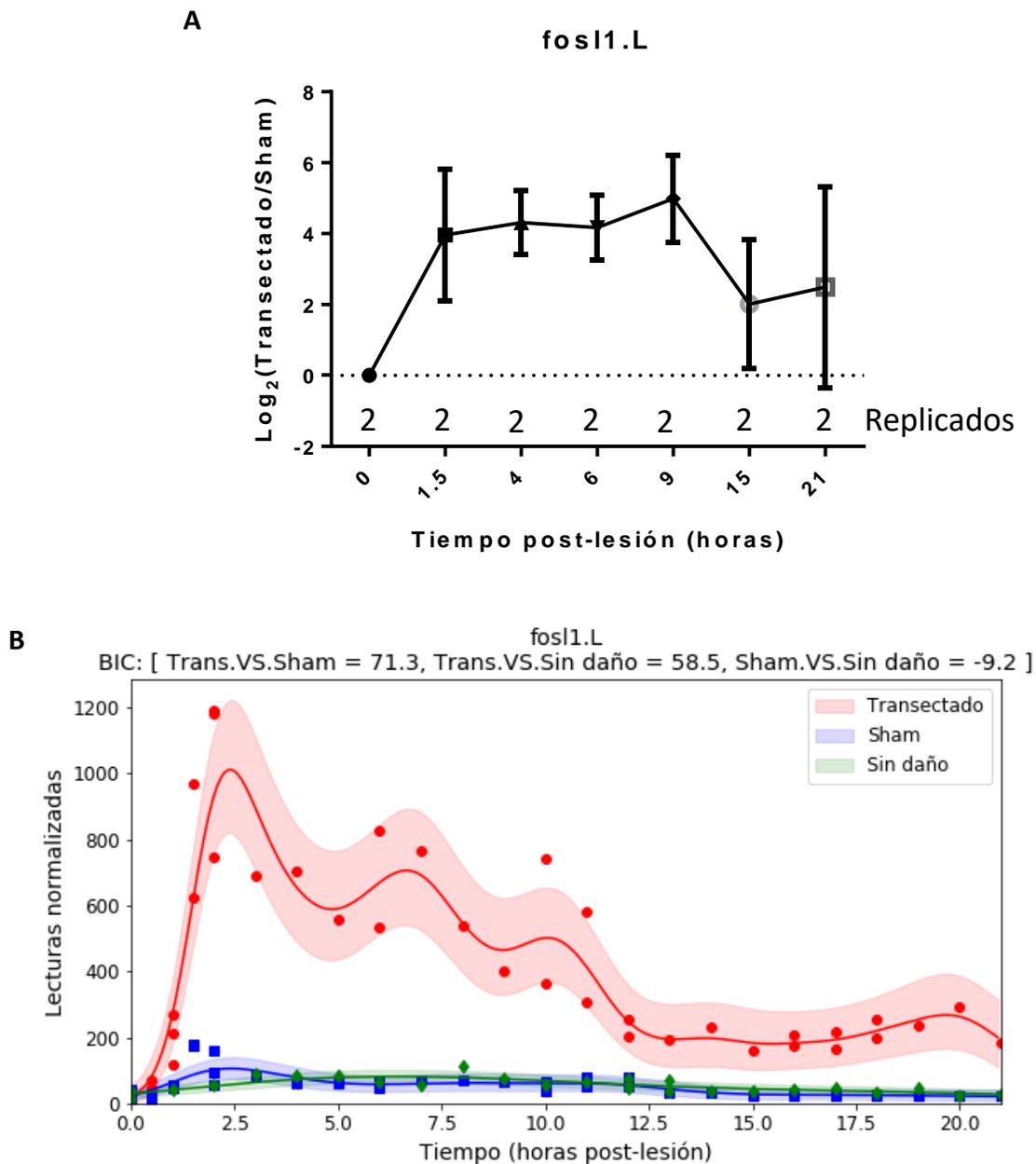


Figura 26. Validación de la expresión del gen *fosl*. A. Gráfico de la expresión del gen *fosl* evaluada mediante qPCR, se informa el Log_2 de la razón entre la condición transectado y sham B. Modelamiento mediante Procesos Gaussianos de la expresión del gen *fosl* en ensayos de transcriptómica.

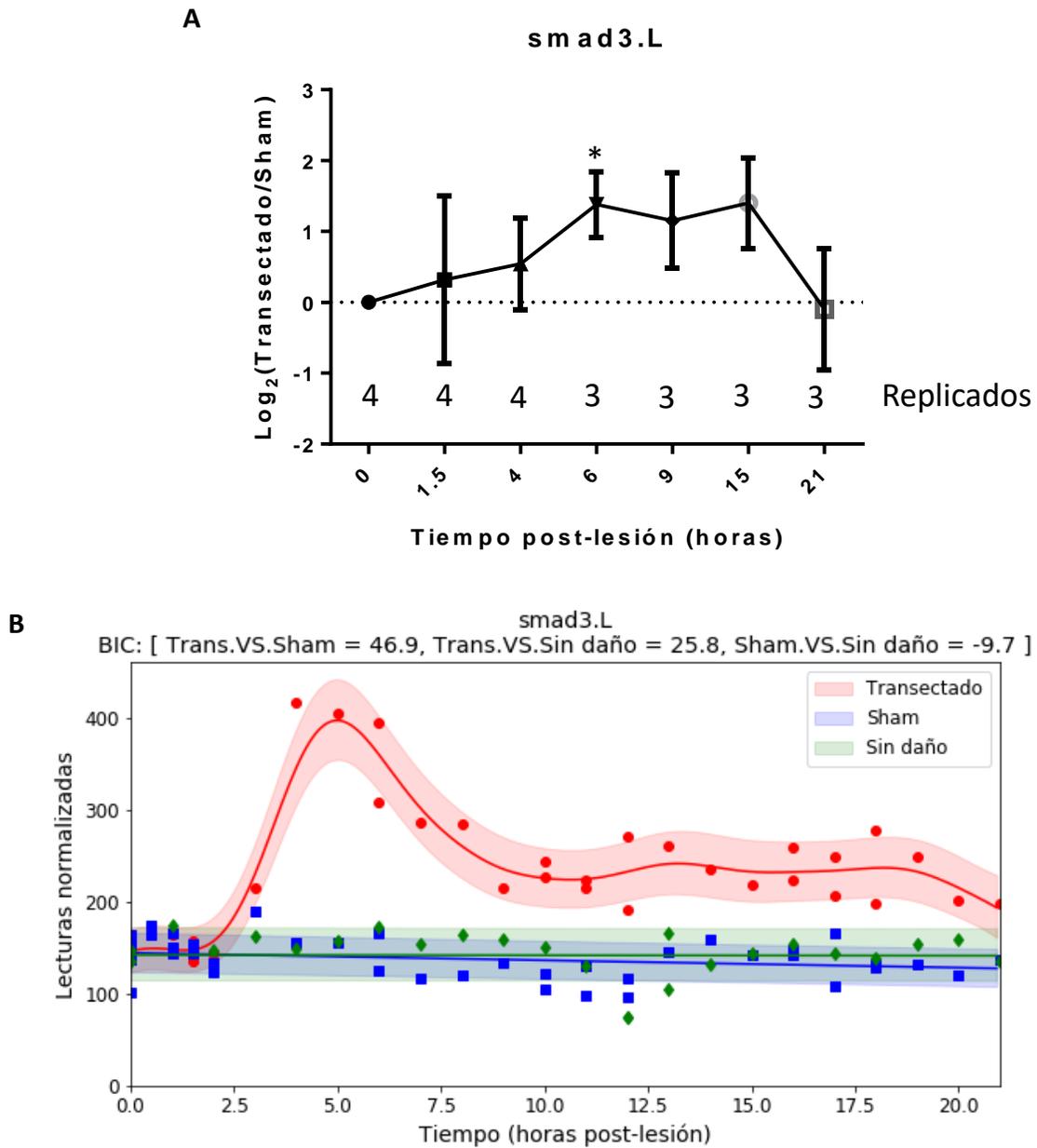


Figura 27. Validación de la expresión del gen *smad3*. A. Gráfico de la expresión del gen *smad3* evaluada mediante qPCR, se informa el Log_2 de la razón entre la condición transectado y sham (*: valor- $p \leq 0,05$). B. Modelamiento mediante Procesos Gaussianos de la expresión del gen *smad3* en ensayos de transcriptómica.

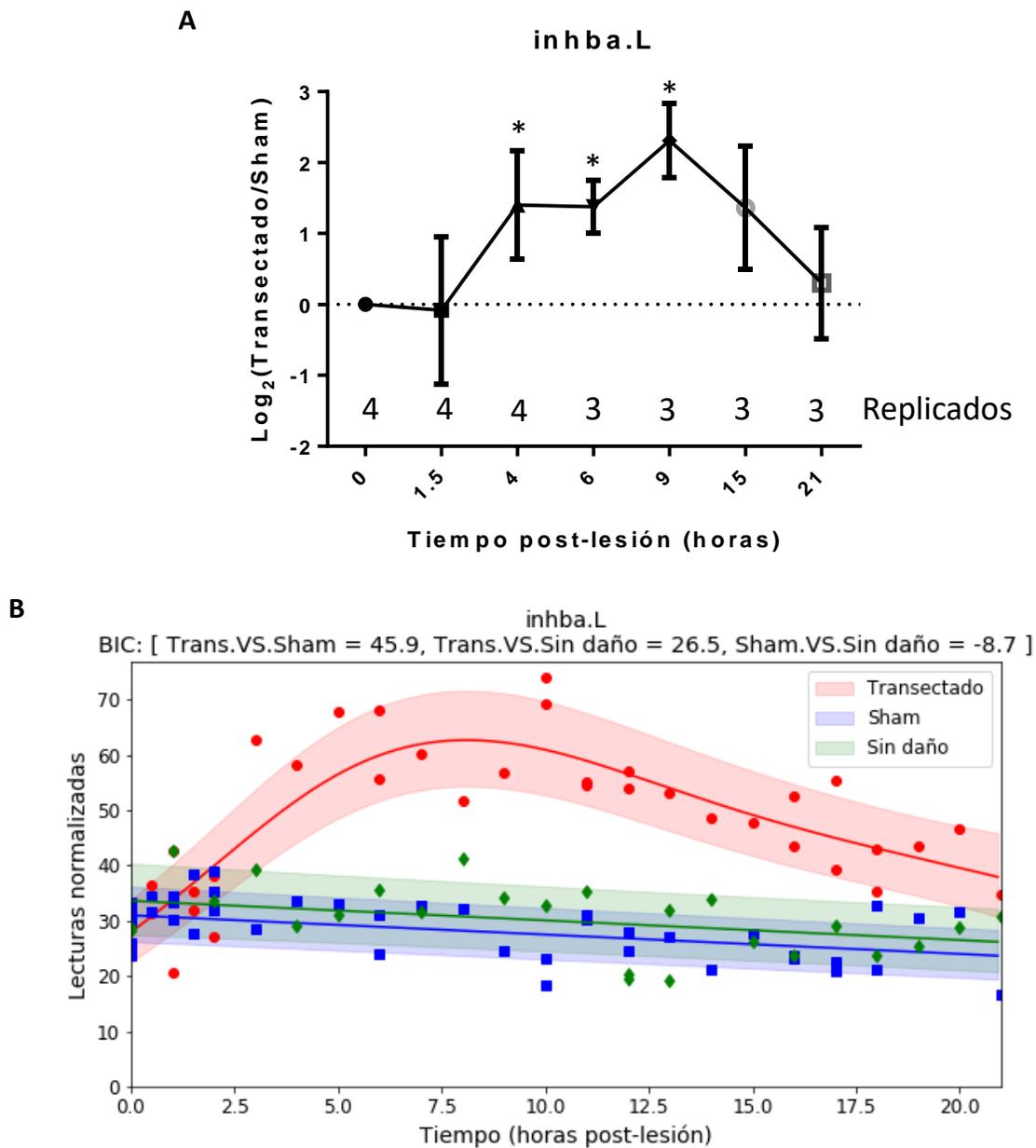


Figura 28. Validación de la expresión del gen *inhba*. A. Gráfico de la expresión del gen *inhba* evaluada mediante qPCR, se informa el Log_2 de la razón entre la condición transectado y sham (*: valor- $p \leq 0,05$). B. Modelamiento mediante Procesos Gaussianos de la expresión del gen *inhba* en ensayos de transcriptómica.

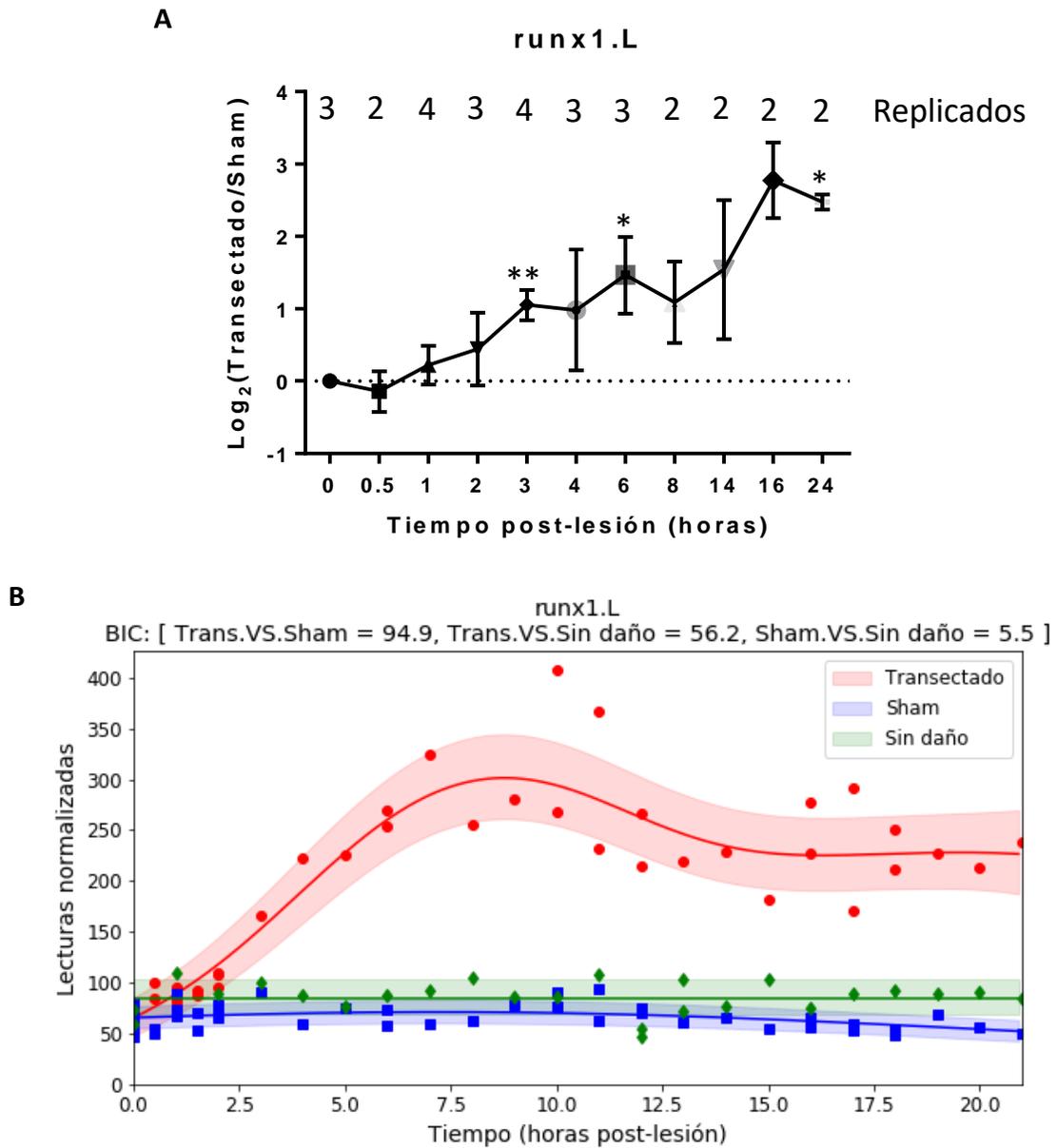


Figura 29. Validación de la expresión del gen *runx1*. A. Gráfico de la expresión del gen *runx1* evaluada mediante qPCR, se informa el Log_2 de la razón entre la condición transectado y sham (*: valor- $p \leq 0,05$; **: valor- $P \leq 0,01$). B. Modelamiento mediante Procesos Gaussianos de la expresión del gen *runx1* en ensayos de transcriptómica.

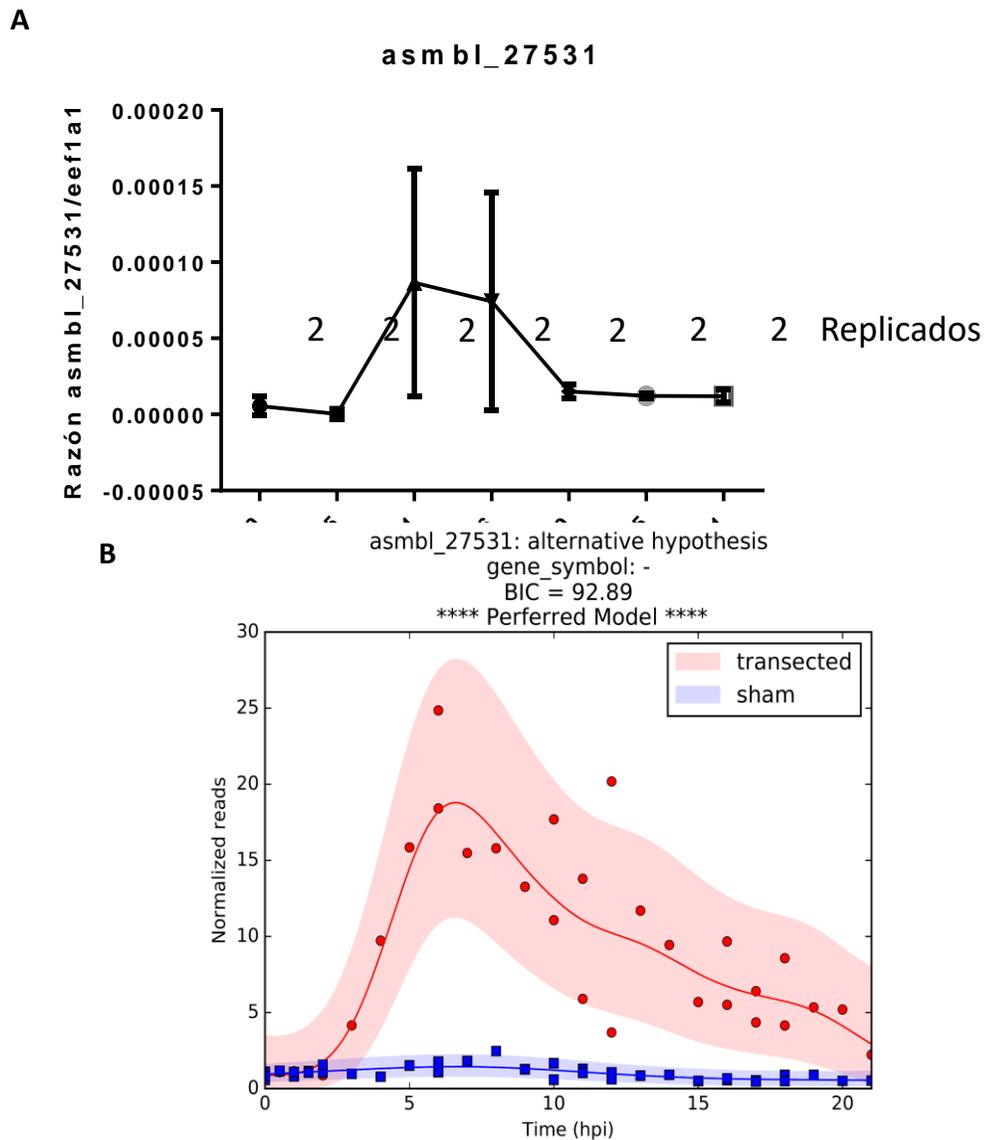


Figura 30. Validación de la expresión del gen *asmbl_27531*. A. Gráfico de la expresión del gen *fosl* evaluada mediante qPCR, se informa la expresión relativa de este transcrito respecto al gen control *eef1a1*. B. Modelamiento mediante Procesos Gaussianos de la expresión del gen *fosl* en ensayos de transcriptómica.

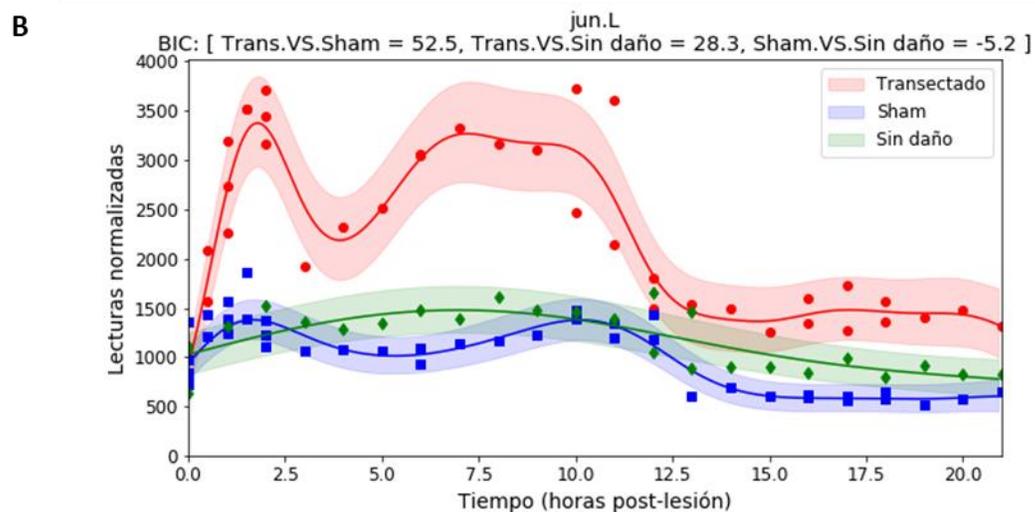
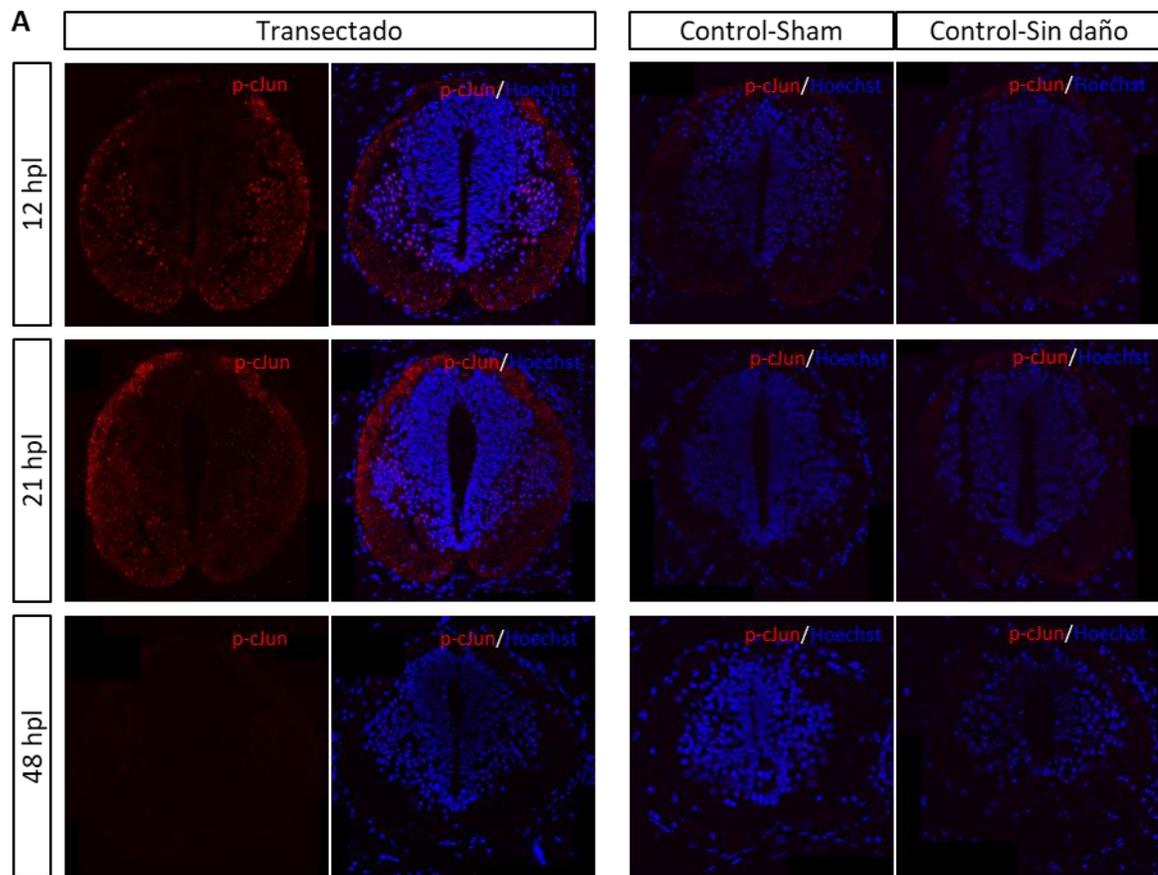


Figura 31. Evaluación de la activación del factor de transcripción jun. A. Evaluación de la activación de factor de transcripción jun (p-jun) mediante IFI. B. Modelamiento mediante Procesos Gaussianos de la expresión del gen jun en ensayos de transcriptómica.

4.3 Determinación de la función de genes y/o vías de señalización en el proceso de regeneración de la médula espinal.

4.3.1 Smad3 y su participación en la regeneración de la médula espinal.

Smad3 es un factor de transcripción de la vía TGF- β /activina (**Fig. 32**). Nuestros datos de secuenciación masiva muestran una expresión diferencial tanto para *smad3* como para *inhba*, un ligando de la vía TGF- β , con un BIC de 46.94 y 45.89 respectivamente (transectado-vs-sham) (**Fig. 27B y 28B**), también en esta vía de señalización mapearon 13 del total de los genes diferencialmente expresados (**Fig. 32**). Además, otros análisis bioinformáticos mostraron un enriquecimiento para el sitio de unión de *smad3* al ADN en los promotores proximales de los módulos I3, L1 y L3 (**Fig. 21**). También, en redes de interacción proteína-proteína entre los factores de transcripción diferencialmente expresados, pudimos observar que *smad3* era la proteína con mayor número de conexiones en esta red (**Fig. 23, Tabla 8**). Todos estos antecedentes, indicaban que *smad3* podía ser un gen necesario en la regeneración de la médula espinal.

En una primera etapa nuestros esfuerzos estuvieron puestos en validar la expresión diferencial de ambos genes. En el caso de *smad3* validamos mediante RT-qPCR su expresión diferencial sólo a las 6 hpt (**Fig. 27A**), mientras para *inhba* se validó una expresión diferencial a 4, 6 y 9 hpt (**Fig. 28A**).

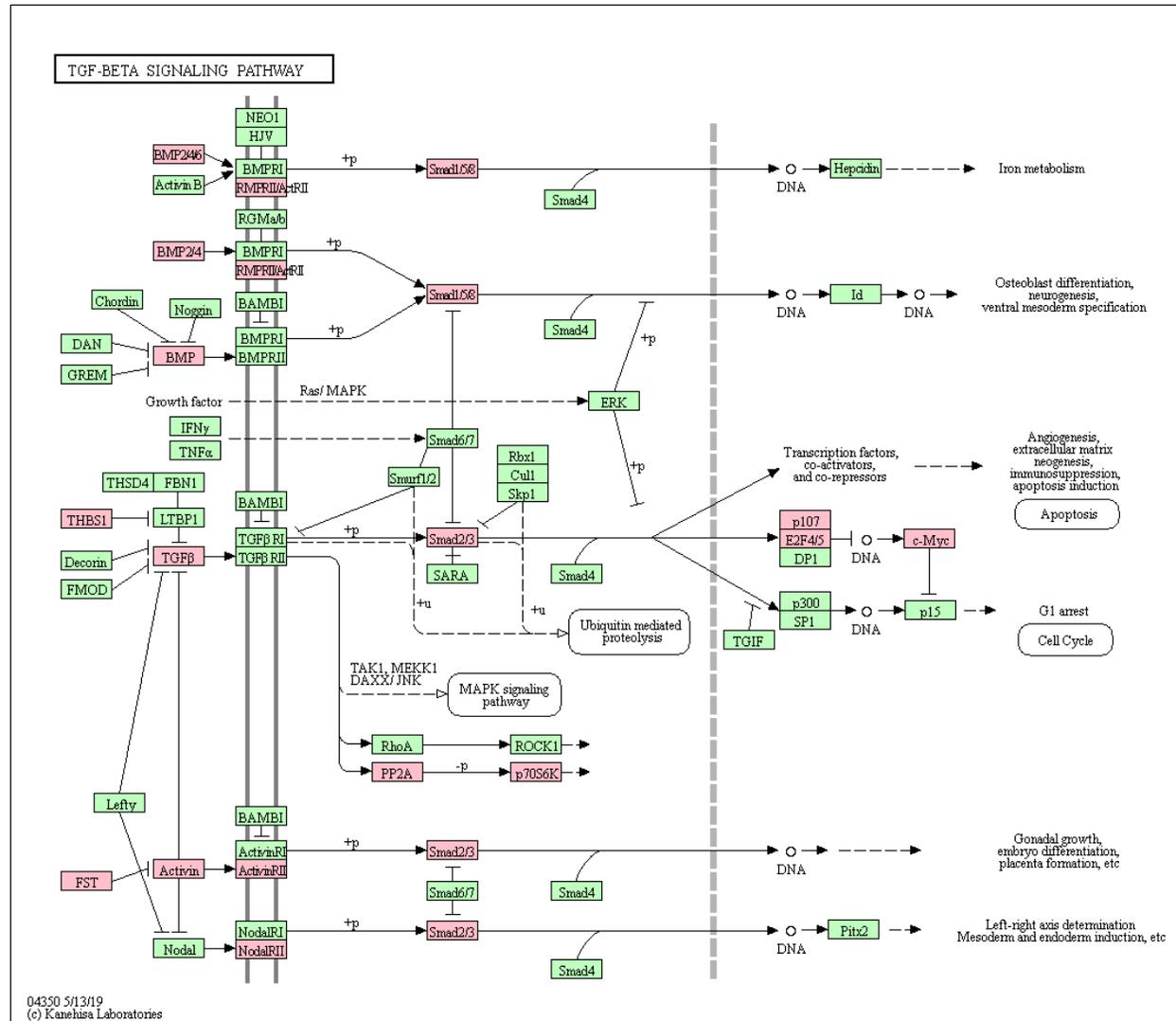


Figura 32. Esquema del modelo humano de la vía de señalización TGF- β . En color rosado son destacados todos los componentes de esta vía de señalización, los cuales fueron identificados como diferencialmente expresados en nuestros análisis. Imagen extraída de <http://www.genoma.jp/kegg>, correspondiente al modelo de vía de señalización humana.

Posterior a la etapa de validación procedimos a realizar análisis de inmunofluorescencia para identificar en que poblaciones celulares estaría siendo activado *smad3*. Debido a que *smad3* es transcripcionalmente activo posterior a su fosforilación, procedimos a evaluar la proteína en este estado. En la **Fig. 33** se muestra una inmunofluorescencia comparativa entre animales sham y transectado, en la cual podemos observar un aumento en la fosforilación de *smad3* a 16 horas después de la lesión en el animal transectado. Este aumento es aparentemente observado tanto en progenitores neurales como neuronas, sin embargo, es posible observar una localización citoplasmática, lo cual es contradictorio para la localización que esperaríamos para un factor de transcripción activo.

Debido a que nuestro análisis transcriptómico evaluó los cambios transcripcionales de la región caudal al sitio de la lesión, procedimos a evaluar el nivel de fosforilación de *smad3* 220 μm caudal y rostral al sitio de la transección, con el objetivo de comparar la respuesta en ambos segmentos. En la **Fig. 34** se puede observar que tanto el segmento caudal como rostral a la lesión presenta mayores niveles de fosforilación en el animal transectado respecto a un animal sham. En el caso del animal control se estableció un sitio putativo de lesión a un nivel rostro-caudal equivalente. Además, en el animal transectado es posible observar un mayor nivel de fosforilación en el segmento caudal a la lesión respecto a su contraparte rostral, lo cual sugeriría un grado de activación de la vía distinto para ambos segmentos.

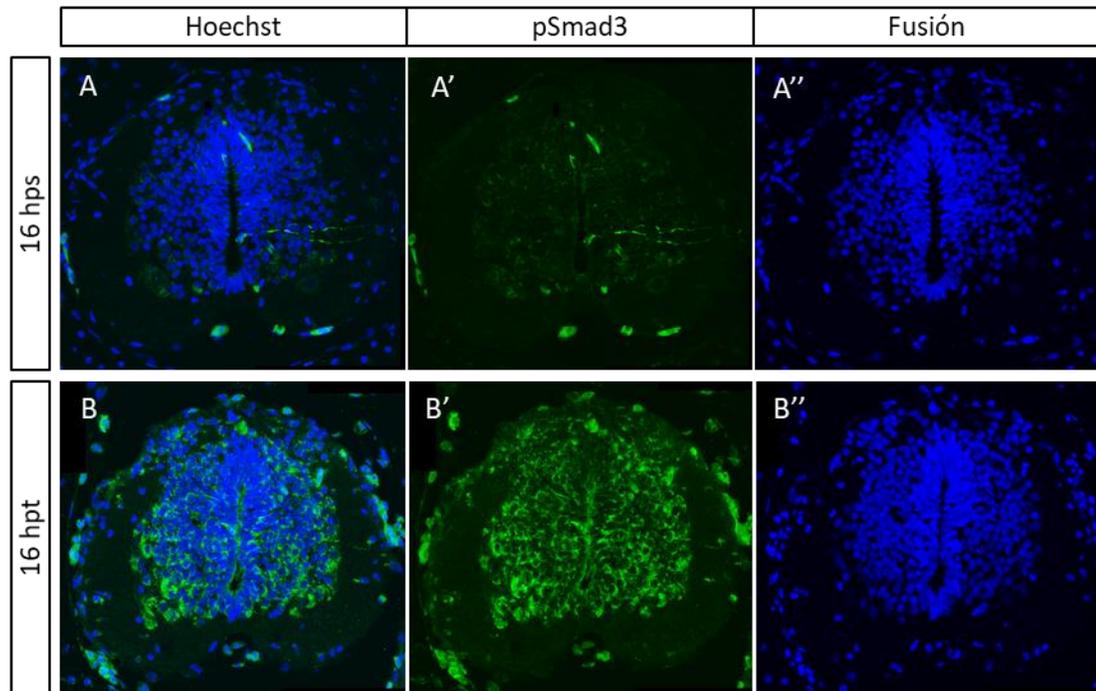


Figura 33. Evaluación de los niveles de p-Smad3 luego de la transección. Animales estadio 50 fueron fijados a 16 hps (A-A'') y 16 hpt (B-B'') en experimentos realizado en paralelo. Posteriormente, analizamos los niveles de p-Smad3 (forma activada; A',B') mediante inmunofluorescencia en cortes transversales de médula espinal, específicamente en la zona caudal a la lesión. hpt: horas post-transección.

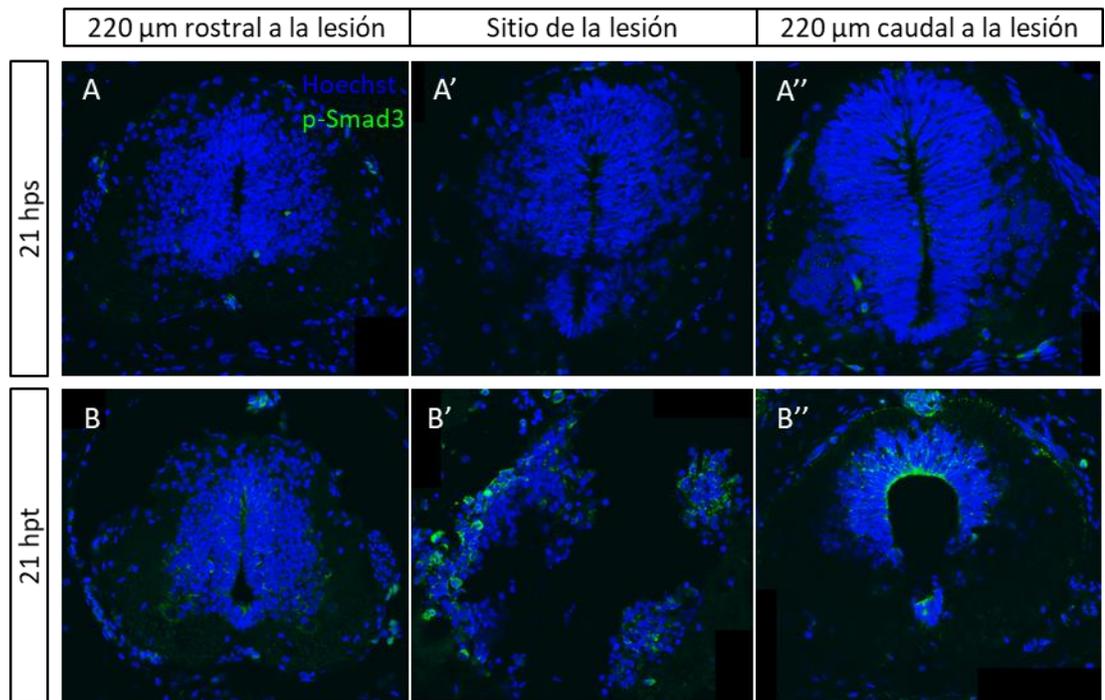


Figura 34. Comparación de la activación de p-Smad3 en regiones rostral y caudal a la lesión de la médula espinal. Animales estadio 50 fueron fijados a 21 hps (A-A'') y 21 hpt (B-B'') en un experimentos realizado en paralelo. Posteriormente, analizamos los niveles de p-Smad3 (forma activada; en verde) mediante inmunofluorescencia en cortes transversales de médula espinal. Analizamos los niveles de activación de Smad3 en la zona rostral a la lesión (A,B), zona de lesión (A',B') y zona caudal a la lesión (A'',B'').

Estos resultados sugerirían una activación transitoria de Smad3, al igual que la activación del mensajero, debido a la disminución observada en la marca desde 16 a 21 horas en la condición transectado (**Figuras 33B y 34B''**, respectivamente). Por otra parte, si bien ambos corresponden a experimentos independientes, en ambos casos son ensayos con $n = 1$ debido a que no fue posible replicar estos resultados. Además, es importante mencionar que no logramos una marca específica con el anticuerpo de Smad3 total (Datos no mostrados), lo cual es un problema habitual en nuestro modelo debido a la ausencia de anticuerpos específicos para *Xenopus*.

Debido a la ausencia de anticuerpos específicos, nuestro siguiente paso fue evaluar la actividad transcripcional de Smad3 y con este objetivo procedimos a co-electroporar animales con un vector constitutivo activo (CAG::EGFP) y un reportero transcripcional de Smad3 (12xCAGA-CMV::nls-mCherry), el cual consiste de una proteína mCherry con señal de localización nuclear comandada por un promotor mínimo CMV acoplado a 12 cajas CAGA (Sitio de reconocimiento de Smad3) [Casari et al., 2014]. Un día después de la electroporación estos animales fueron sometidos a operaciones sham ($n=5$) y transección ($n=10$), manteniendo también un grupo de animales sin dañar como control ($n=3$). Dos días después de la operación estos animales fueron fijados y las médulas fueron montadas completas para su análisis en un microscopio confocal. Finalmente, las imágenes fueron procesadas y las células marcadas y doblemente marcadas fueron contadas en ImageJ.

En la **Fig. 35** se pueden observar un animal representativo para cada condición de este experimento. En esta imagen se observa un número similar de células verdes para las tres condiciones, lo cual se vio reflejado en el conteo de células con valores de 95; 73,8 y 97,4 para

las condiciones sin daño, sham y transectado respectivamente. Lo cual nos indicaría que todas fueron co-electroporadas en igualdad de condiciones, ya que tienen un número similar de células que expresan el control de electroporación.

Por otra parte, en el plano aumentado se puede observar un menor número de células doblemente marcadas para el animal sin daño, respecto a los animales sham y transectado, los cuales muestran un número mayor de células doblemente marcadas, pero a la vez similar entre estas dos últimas condiciones. Esta última observación es representativa de nuestro conteo, donde obtuvimos un 4,8% de células verdes doblemente marcadas para los animales sin daño, y un 13,9% y 10,2% para animales sham y transectados respectivamente. Las células doblemente marcadas corresponderían a células positivamente electroporadas y en las cuales Smad3 sería transcripcionalmente activo, sin embargo, no es posible observar diferencias claras en el número de estas células para la condición sham y transectado.

De esta manera, la localización citoplasmática de Smad3 y la ausencia de diferencias en su actividad transcripcional entre las condiciones transectado y sham, nos sugieren que este factor de transcripción no estaría jugando un rol activo en las primeras etapas de la regeneración de la médula espinal. Sin embargo, debido a las limitaciones metodológicas no nos es posible afirmarlo completamente.

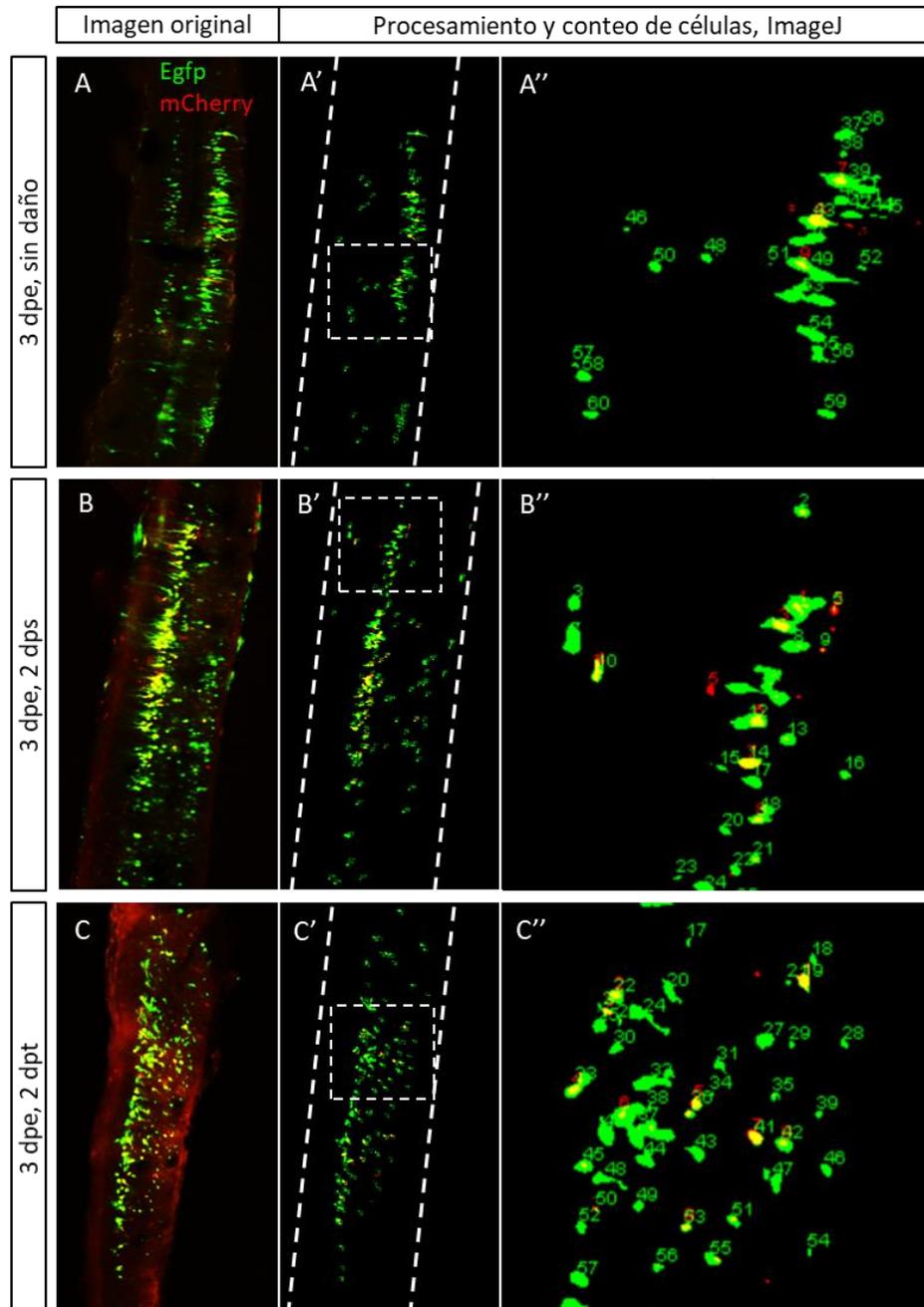


Figura 35. Evaluación de la actividad transcripcional de smad3. Renacuajos estadio 50 fueron coelectroporados con un vector CAG-Egfp (constitutivo activo) y un vector 12xCAGA-CMV-mCherry (reportero smad3). Un día después fueron divididos en tres grupos, sin daño (A-A''), sham (B-B'') y transectados (C-C''), sometidos a sus respectivas cirugías y fijados dos días después. Las médulas fueron aisladas, montadas completas y posteriormente visualizadas en un microscopio confocal (A,B,C). El conteo de células se realizó con ImageJ (A',B',C') y mayores magnificaciones de las regiones del conteo, resaltados con cuadros blancos, son mostradas en A'', B'' y C''. dpe: días post-electroporación; dps: días post-sham; dpt: días post-transección.

4.3.2 Vía de señalización mTOR y su rol en la regeneración de la médula espinal

Nuestros análisis bioinformáticos también sugerían la participación de la vía mTOR durante el inicio de la regeneración de la médula espinal, ya que en el módulo D1 observamos un enriquecimiento en genes asociados a la señalización de mTOR. Específicamente detectamos una disminución en la expresión de varios reguladores negativos de esta vía, sugiriendo una posible activación. También observamos un aumento en genes asociados a la regulación traduccional de la expresión génica, los cuales están estrechamente relacionados al complejo mTORC1, una de las dos ramas efectoras de la vía mTOR. Experimentalmente, esto fue corroborado en nuestro laboratorio evaluando los niveles de pS6 (blanco de la rama de mTORC1) mediante WB, observando una activación temprana de la vía a las 3, 6 y 12 hpt (Trabajo de Claudia Parra, Apéndice 10). Estos datos nos llevaron a considerar que la vía mTORC1 podría ser importante durante la activación del proceso de regenerativo de la médula espinal.

En una primera etapa y para estudiar su patrón de activación, se realizaron inmunofluorescencias de la forma fosforilada de S6 (pS6) por ser un blanco directo de RPS6KB1, la cual ha sido asociado a la biogénesis de ribosomas y síntesis de proteínas. A las 3 hpt se observa una activación de la vía, la cual no se observa en los controles (**Fig. 36A-A''**). También se observa un aumento de la señal en células de la meninge, así como también en los citoplasmas de células más alejadas del canal central, las cuales por ubicación podrían corresponder a neuronas (Destacadas con flechas blancas en la **Fig. 36A', B'**). En la zona ventral de la médula espinal se observa una célula de gran tamaño, probablemente una motoneurona. 12 horas después de la lesión es posible observar el mismo patrón de marcación,

sin embargo, con un mayor grado de intensidad, nuevamente es posible apreciar la marcación en citoplasma de células de gran tamaño en la región ventral de la médula (**Fig. 36B-B''**). También a 21 horas se observa patrón similar con un aumento en la intensidad, lo cual nos sugeriría una activación progresiva durante las 21 horas estudiadas (**Fig. 36C-C''**). Respecto a la evaluación de los niveles de pS6, mediante WB se había observado una disminución en sus niveles de fosforilación a las 21 horas, lo cual no se correlaciona con nuestras observaciones por IFI, donde vemos que los niveles van aumentando gradualmente y alcanzan su mayor nivel a este tiempo.

También decidimos evaluar de manera indirecta la traducción cap-dependiente coordinada por la mTORC1, para lo cual evaluamos el grado de fosforilación de la proteína 4E-BP1 (p4E-BP1). Hicimos una evaluación del grado de fosforilación de esta proteína mediante IFI a 12 y 21 horas después de la transección (**Fig. 37**). 12 horas después de la lesión es posible observar un aumento de p4E-BP en células de la meninge, sin embargo, a diferencia de lo observado con pS6, en este caso es posible observar la forma fosforilada de esta proteína en células del canal central, las cuales corresponderían a progenitores neurales. Por otra parte, por localización, no se observa una clara activación en neuronas maduras ni inmaduras. A tiempos posteriores (21 horas) se observa una disminución en la marca de progenitores neurales, sin embargo, la marca en células de la meninge se mantiene.

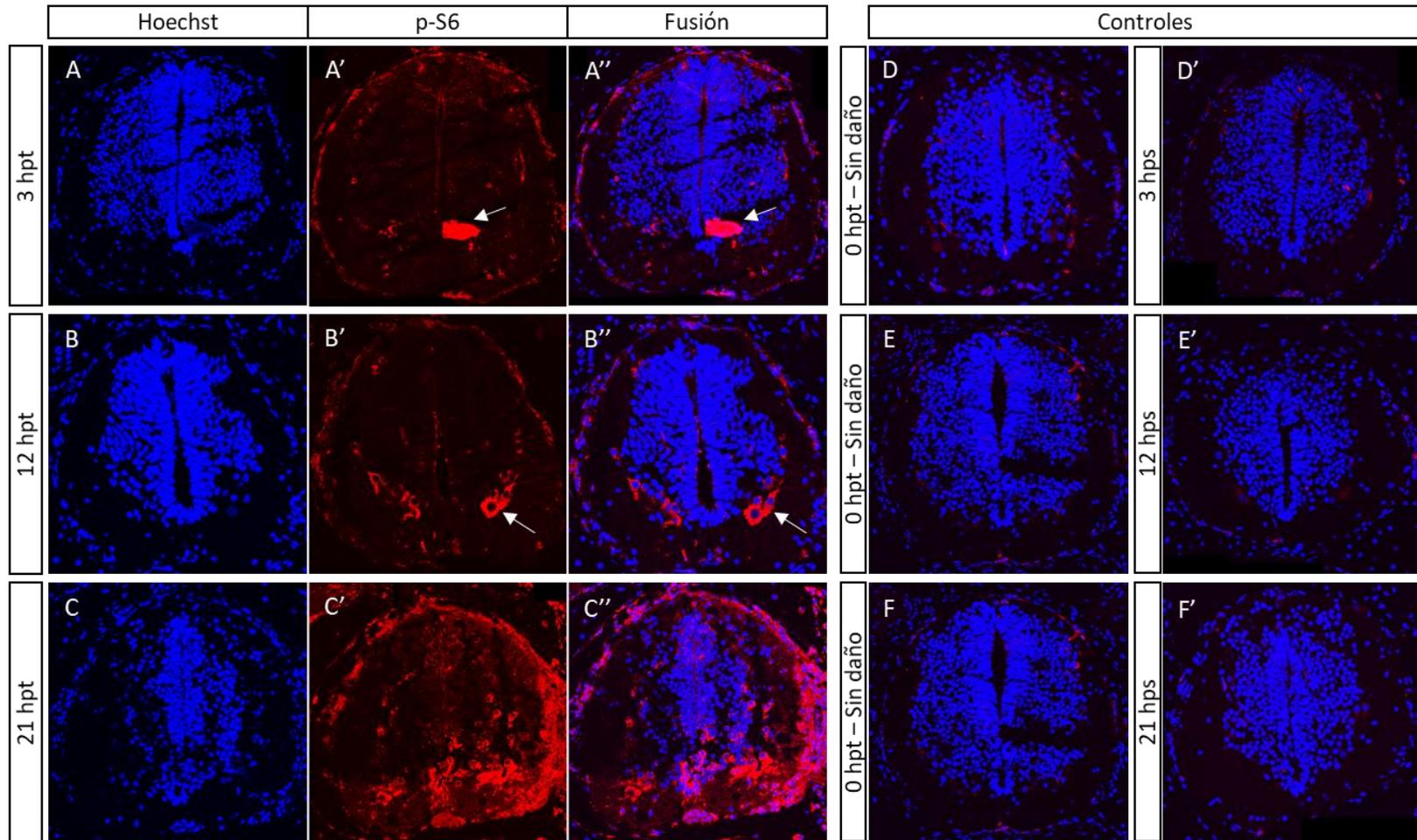


Figura 36. Daño en la médula espinal induce una temprana y progresiva activación de S6. Inmunofluorescencias para p-S6 fueron realizadas en cortes transversales de animales transectados y posteriormente fijados a 3 hpt (A-A''), 12 hpt (B-B'') y 21 hpt (C-C''). Se observa un rápido y progresivo aumento en los niveles de fosforilación de esta proteína luego de la lesión, el cual se produce mayoritariamente en la zona ventral de la médula espinal. Con flechas blancas se marca la marcación de aparentes motoneuronas. Los controles sin daño (0 hpt) (D,E,F) y sham realizados a tiempos equivalentes, 3 hps (D'), 12 hps (E') y 21 hps (F') muestran escasos niveles de p-S6. hpt: horas post-transección; hps: horas post-sham.

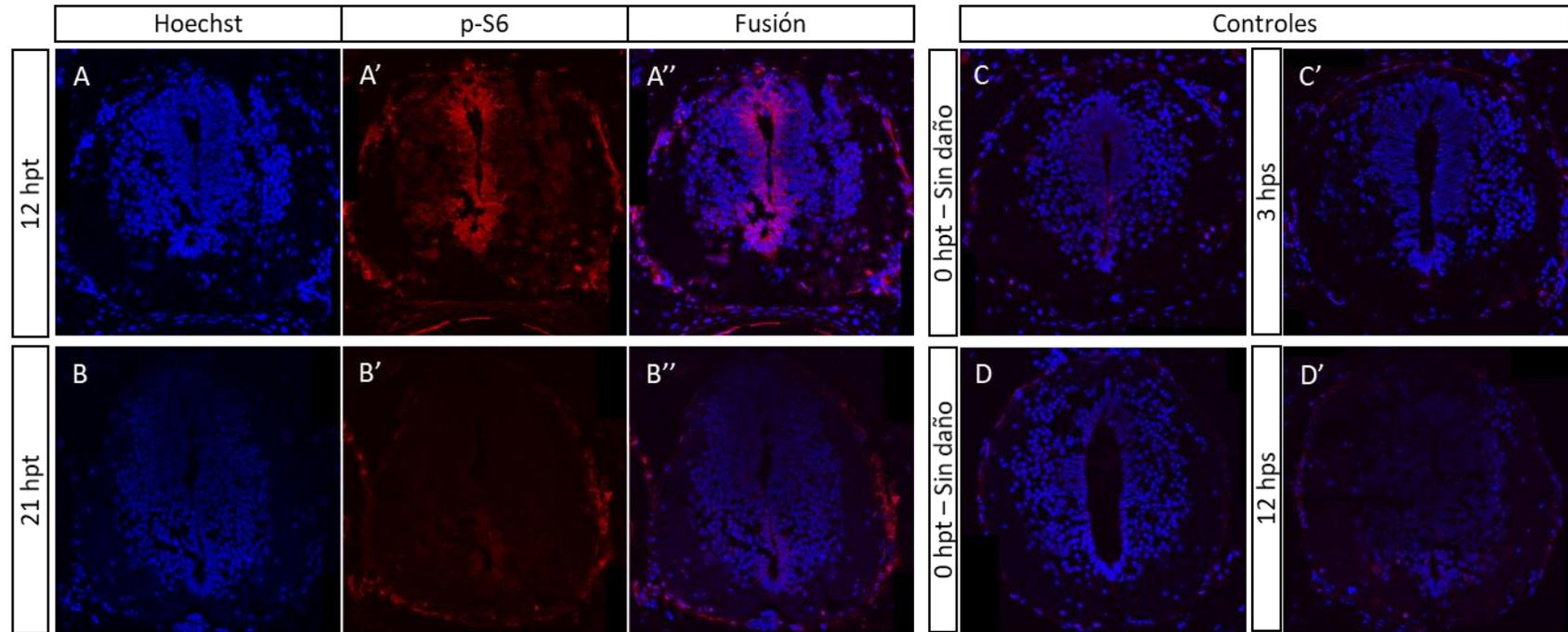


Figura 37. Daño en la médula espinal induce una fosforilación transitoria de 4E-BP1. Inmunofluorescencias para p-4E-BP1 fueron realizadas en cortes transversales de animales transectados y posteriormente fijados a 12 hpt (A-A'') y 21 hpt (B-B''). Se observa un aumento en la fosforilación de 4E-BP1 en las células del canal ependimario a 12 hpt, con una rápida disminución a 21 hpt. Los controles sin daño (0 hpt) (C,D) y sham realizados a tiempos equivalentes, 12 hps (C') y 21 hps (D') muestran escasos niveles de p-4E-BP1. hpt: horas post-transección; hps: horas post-sham.

Una de las interrogantes que surgió durante los ensayos anteriores fue saber en qué poblaciones celulares se estaba activando mTORC1. En la **Fig. 38** podemos observar en cortes longitudinales que a 21 hpt hay una clara presencia de pS6 en células del canal central de la médula espinal, y específicamente en una zona muy acotada y cercana a la lesión. Esto no había sido apreciado previamente en cortes transversales, probablemente por ser una región muy reducida. En esta figura también podemos observar que algunas motoneuronas (islet-1+) presentan una activación de S6.

Con el objetivo de saber si las células del canal central con altos niveles de pS6 correspondían a progenitores neurales, realizamos una doble IFI para pS6 y Sox2 (**Fig. 39**). En este ensayo pudimos observar que aparentemente en cortes transversales cercanos a la zona de la lesión existiría una co-localización, sin embargo, esta marca fue acotada a células Sox2⁺ ubicadas en la zona ventral de la médula espinal.

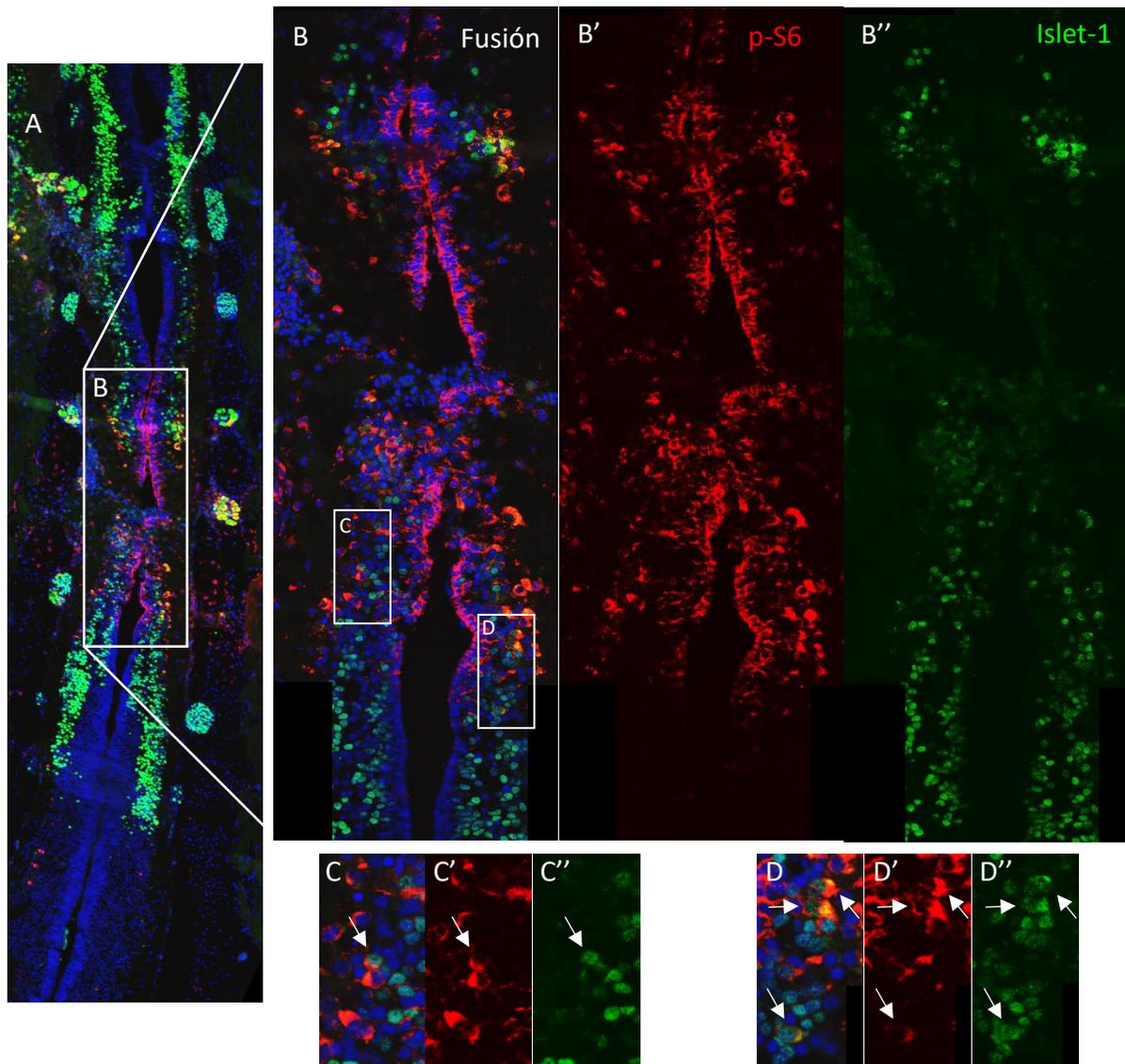


Figura 38. S6 es activado en motoneuronas y células del canal endimario luego de la transección. Renacuajos estadio 50 fueron fijados 21 hpt. Posteriormente, analizamos la localización de p-S6 (forma activa, en rojo) y Islet1 (en verde) mediante inmunofluorescencia en cortes longitudinales de médula espinal. En B,B',B'' se observan magnificaciones de la sección de A destacada en el rectángulo. C,C',C'',D,D',D'' corresponden a magnificaciones de los rectángulos destacados en B, en estas imágenes se destacan con flechas las células donde existe una aparente colocalización entre p-S6 (B') y Islet-1 (B'').

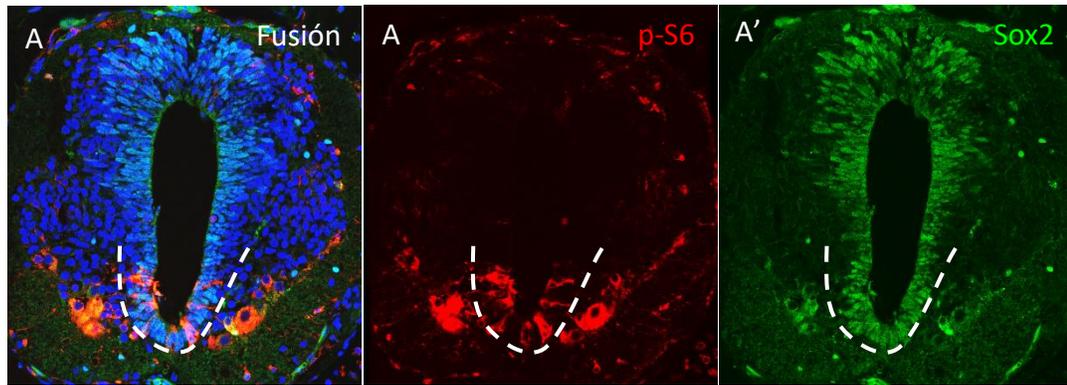


Figura 39. S6 es activada en células Sox2 positivas cercanas a la zona de transección. Renacuajos estadio 50 fueron fijados a 21 hpt. Posteriormente, analizamos la colocalización de p-S6 (forma activa, en rojo) y Sox2 (en verde) mediante inmunofluorescencia en cortes transversales de médula espinal (A). Es delimitada con una línea punteada la zona del canal endimario donde existe una aparente colocalización entre p-S6 (A') y Sox2 (A'').

Una de las ventajas de trabajar con la vía mTOR es que existen inhibidores (Rapamicina, Torin 1) y activadores (Ketamina) farmacológicos potentes. Nosotros decidimos inhibir la vía mTOR utilizando rapamicina, para lo cual procedimos a incubar animales transectados en rapamicina 5 y 10 μ M en Barth 0.1X durante las primeras 21 horas luego de la lesión. El nivel de inhibición logrado posterior a la incubación fue evaluado por WB (**Fig. 40A**). Se observa una disminución en los niveles de pS6, la cual pareciera ser dosis dependiente, sin embargo, la variación en los niveles de S6 total no hacen posible concluirlo. Es importante destacar que el nivel de inhibición de esta rama de la vía pareciera ser incluso menor a lo observado en animales sin daño. También es posible observar una disminución en los niveles de p4E-BP1, sin embargo, sus niveles siguen siendo mayores a lo observado en animales sin daño. Previamente en literatura se ha reportado que rapamicina es más efectiva inhibiendo la fosforilación de S6 que de 4E-BP1 [Hartman et al., 2013].

Debido a que la incubación de animales con rapamicina produce una abundante muerte, nuestras incubaciones con la droga fueron acotadas solo a 21 horas. Por esta razón quisimos evaluar el tiempo que se mantiene inhibida la vía (**Fig. 40B**), observando que incluso a 72 horas después de la lesión los niveles de pS6 de los animales tratados con rapamicina durante las primeras 21 horas siguen siendo menores al vehículo. También es posible observar que luego de las 21 horas los niveles de pS6 van disminuyendo en el animal control.

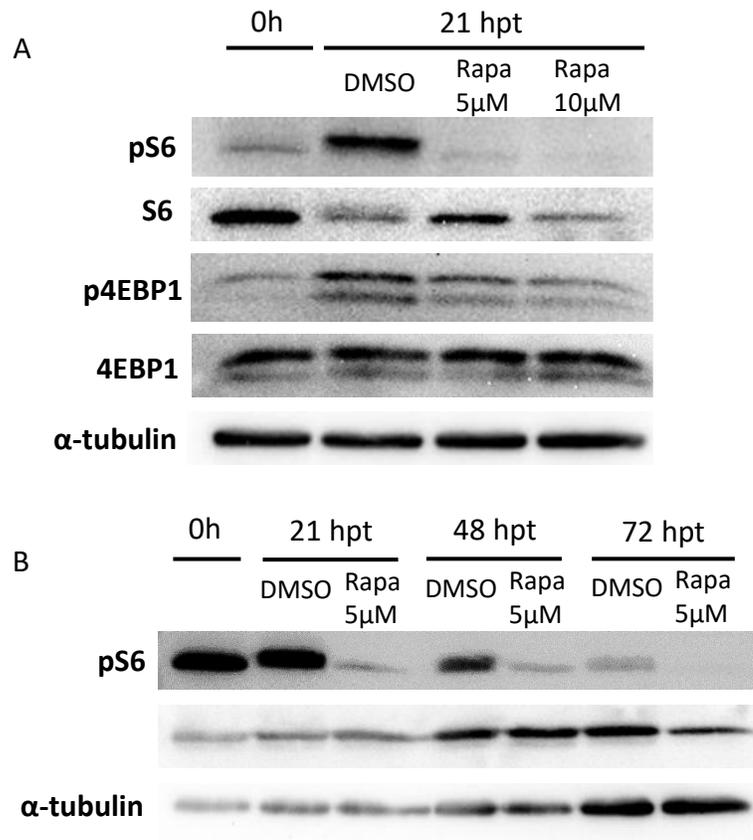


Figura 40. Evaluación del efecto de rapamicina en la regeneración de la médula espinal. (A) Expresión de S6 (28,7 kDa), p-S6 (forma activa), 4EBP1 (Tamaño no identificado) y p-4EBP1 (forma inactiva), analizada mediante Western Blot. Evaluación de los niveles de p-S6 y p-4E-BP1 luego del tratamiento con un vehículo (DMSO) y dos diferentes concentraciones de rapamicina, 5 y 10 μ M. (B) Expresión de S6 (28,7 kDa) y p-S6 (forma activa) mediante Western Blot. Evaluación de los niveles de p-S6 a 21, 48 y 72 hpt luego del tratamiento con un vehículo (DMSO) y rapamicina 5 μ M. hpt: horas post-transección.

Una vez comprobado el efecto de la incubación de la droga en el medio sobre las células de la médula espinal, procedimos a evaluar el resultado de la inhibición de la vía mTOR sobre la recuperación del nado luego de la transección. Para esto los animales fueron nuevamente incubados con la droga durante la primeras 21 horas luego de la transección (**Detalles en Materiales y Métodos, sección 3.2.5.7**). La recuperación del nado fue evaluada 10 días después de la transección y en la **Fig. 41** se pueden observar las distribuciones de la distancia nadada por animales control y tratados con la droga. En este experimento observamos que los animales tratados con Rapamicina tienden a nadar menores distancias que los animales controles y que además estas diferencias son estadísticamente significativas (valor-p = 0,002). Los resultados de la **Fig. 41** corresponden al resumen de dos ensayos de nado realizados de manera independiente, lo cual nos demuestra la robustez de este experimento.

Nuestro siguiente paso fue evaluar las posibles causas por las cuales existen estas diferencias en las distancias nadadas por ambos grupos de animales. Para esto evaluamos la proliferación de células del canal endimario a 48 horas después de la transección, previa inhibición de la vía mTOR durante las primeras 21 hpt con rapamicina 10 μ M. Quisimos evaluar la proliferación de esta población celular, basándonos en observaciones previas de nuestro laboratorio que demostraron la importancia de la proliferación de estas células en la regeneración y posterior recuperación de las capacidades de nado [Muñoz et al., 2015]. Para comparar los niveles de la proliferación de animales controles y tratados con Rapamicina, evaluamos PCNA mediante IFI a 48 horas después de la lesión, observando una clara disminución en la proliferación de células del canal endimario en animales tratados con el inhibidor de la vía mTOR (**Fig. 42**).

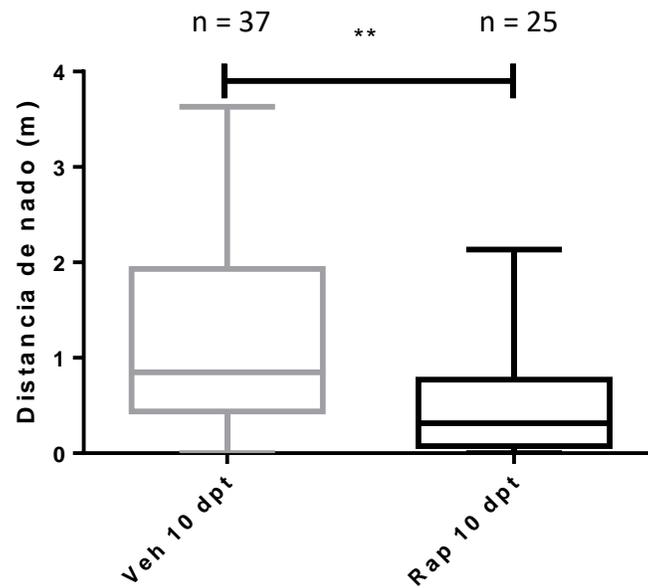


Figura 41. Evaluación de recuperación de la capacidad de nado. En gráfico se observa la comparación de las distancias nada por animales tratados con rapacimina y el vehículo de la droga (DMSO). Se aprecia que existe una diferencia significativa entre ambos grupos (**: valor-p =0,002).

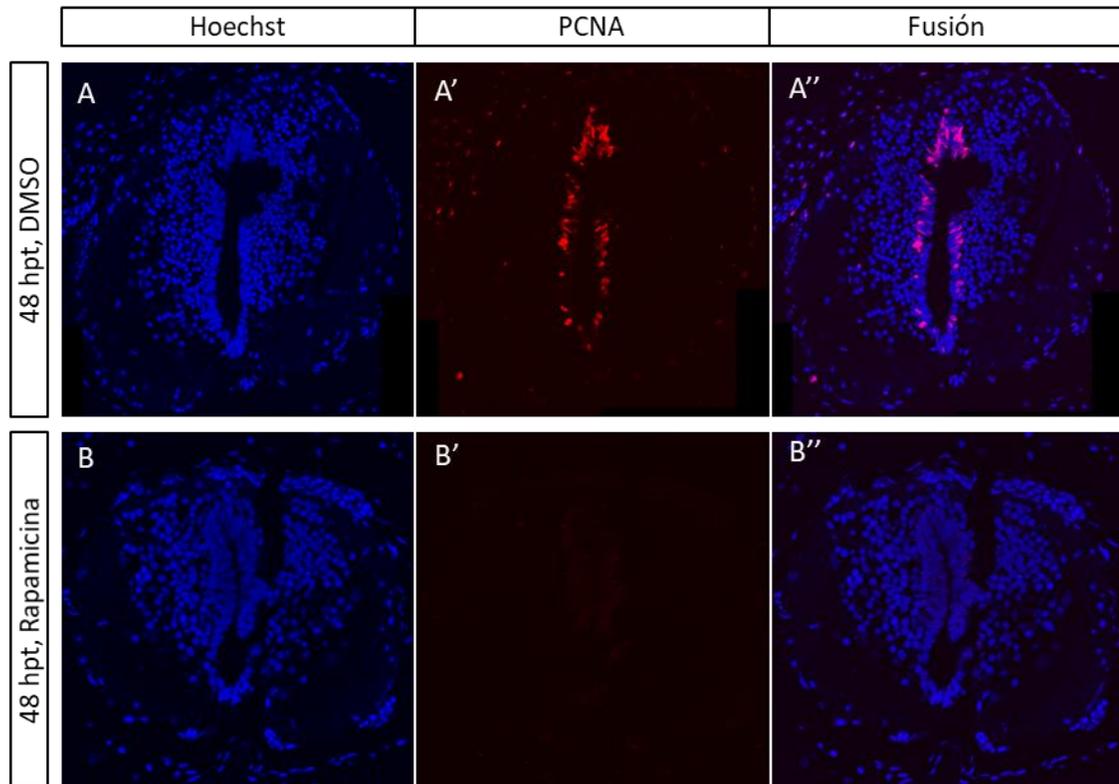


Figura 42. Evaluación de la proliferación de células de células troncales en respuesta a la inhibición de la vía mTOR. Renacuajos estadio 50 fueron fijados a 48 hpt, luego de una incubación con rapamicina 10 μ M durante las primeras 21 hpt. Posteriormente, mediante inmunofluorescencia en cortes transversales de médula espinal, comparamos los niveles de PCNA entre un animal tratado con vehículo (DMSO; A-A'') y otro tratado con rapamicina (B-B'').

En resumen, evaluamos un gen y una vía de señalización, cuya participación durante las primeras 21 horas de la regeneración de la médula espinal era sugerida por nuestros análisis bioinformáticos. En el caso de Smad3 no nos fue posible determinar su activación transcripcional luego de un daño directo a la médula espinal. Por otra parte, en el caso de la vía de señalización mTOR, pudimos validar una temprana activación, así como también tenemos resultados que sugerirían una participación clave durante las etapas tempranas de este proceso regenerativo, ya que su inhibición temprana y transitoria es capaz de bloquear la recuperación de la capacidad de nado de los renacuajos, aparentemente por impedir la proliferación de progenitores neurales.

5 Discusión

Esta tesis se planteó con el objetivo de analizar los cambios tempranos en el transcriptoma de la médula espinal de *Xenopus laevis* (estadio-R) luego de un daño por transección. Nuestro trabajo estaba orientado a entender cómo se estaba iniciando este proceso regenerativo, y de esta manera identificar genes y/o vías de señalización necesarios en la regeneración de la médula espinal. Posteriormente nuestro objetivo era validarlos y analizar el mecanismo molecular en el cual participan durante la regeneración de este tejido.

En este punto es importante resaltar que nuestra investigación es del tipo exploratoria, careciendo así de una hipótesis clara que guíe nuestro trabajo. Existe una gran discusión en torno a este tema, debido a que se ha establecido fuertemente que toda investigación científica debe ser construida en torno a probar o refutar una hipótesis, lo cual incluso ha repercutido en la asignación de financiamiento. Sin embargo, este paradigma no considera que gran parte de conocimiento científico, así como nuevas tecnologías, fueron desarrollados en investigaciones que carecían de una hipótesis, y que simplemente buscaban entender un fenómeno y/o solucionar un problema. De esta manera, una investigación conducida por una pregunta puede ayudarnos a entender de manera más detallada un fenómeno y generar el conocimiento basal para impulsar el interés científico en áreas donde no existía el conocimiento necesario sustentar una hipótesis [Glass y Hall, 2008; O'Malley et al., 2009].

En base a lo anterior, es importante mencionar que a la fecha no existen investigaciones que estudien de manera detallada los cambios del transcriptoma durante etapas tempranas en regeneración de vertebrados, lo cual valida nuestra decisión de realizar un análisis exploratorio del transcriptoma de la médula espinal durante las primeras horas luego de una lesión.

Previamente, nuestro laboratorio hizo estudios de transcriptómica con RNA-seq para analizar la respuesta de la médula espinal luego de un daño por transección, concluyendo a nivel metodológico el óptimo funcionamiento de esta técnica en nuestro modelo, y a nivel de resultados la presencia de un amplio despliegue de ARNm en animales estadio-R a las 21 horas, a diferencia de lo que sucedía en animales estadio-NR, donde el número de genes desplegados era considerablemente menor [Lee-Liu et al., 2014].

Ambos antecedentes sugerían la importancia de analizar tempranamente, y de manera más detallada, los niveles de ARNm de la médula espinal en animales regenerativos. Gracias a establecer una colaboración con el Laboratorio del Dr. Michael Gilchrist en el Francis Crick Institute en Londres, pudimos proponer como metodología de análisis el uso de perfiles de expresión de alta resolución temporal [Collart et al., 2014]. Estos nos permitirían modelar los perfiles de expresión de una gran variedad de transcritos con el objetivo de conocer de manera más precisa su temporalidad, entendiendo de mejor manera como se produce la activación del transcriptoma regenerativo, ya que al conocer la temporalidad de la activación de los ARNm podemos reconstruir de manera más exacta los eventos que están sucediendo. Además, esta técnica utiliza un sistema de pseudo-réplicas debido a los cortos intervalos de tiempo a los que se realizan los muestreos, lo que nos permitiría detectar genes consistentemente activados, reduciendo así el número de falsos positivos en nuestros análisis. También, los datos generados por transcriptómica podrían ser utilizados para reconstruir nuevos ARNm aún no descritos en bases de datos y que pudiesen estar participando en la regeneración de la médula espinal.

Finalmente, poder reconstruir lo que está sucediendo a nivel transcripcional durante las primeras horas luego de una lesión en la médula espinal de animales regenerativos, nos permitirían identificar genes o vías de señalización que pudiesen ser claves en este proceso.

5.1 Identificación de los cambios globales del transcriptoma desplegados en la médula espinal durante las primeras 21 horas posteriores al daño

5.1.1 Calidad de muestras de ARN y sus respectivas secuenciaciones.

De esta manera, la primera etapa de esta tesis fue la recolección del material biológico necesario para la construcción de los perfiles de expresión de alta resolución temporal. Ideamos una manera que nos permitió un muestreo óptimo cumpliendo siempre con los tiempos establecidos, lo cual se vio reflejado posteriormente en la continuidad de los perfiles de expresión génica dentro de las series. El primer problema al que nos vimos enfrentados fueron las variaciones en los rendimientos de ARN total obtenidos durante el muestreo. En el ensayo piloto obtuvimos 8 muestras con rendimientos inferiores a 0,5 μg de ARN utilizando 10 animales por punto, y esa fue la razón por la que decidimos utilizar 12 animales por punto en los ensayos posteriores. Sin embargo, el ARN extraído fue suficiente para la preparación de las librerías de secuenciación, debido a que el kit indica que puede ser utilizada una cantidad entre 100 – 1.000 ng. Además, dentro de una misma serie de tiempo siempre ocupamos igual cantidad de ARN total para preparar cada una de las librerías, lo cual nos ayudó a disminuir las variaciones dentro de las series de tiempo. Estas variaciones en los rendimientos las atribuimos principalmente a la variabilidad de tamaño de los animales dentro de una misma fertilización, ya que si bien todos los animales utilizados fueron seleccionados en estadios 49 –

51 de acuerdo a características morfológicas (específicamente la forma y tamaño de la extremidad posterior), el tamaño de estos varia incluso dentro de una misma fertilización.

Por otra parte, respecto a la calidad de las extracciones de ARN, obtuvimos valores de pureza de acuerdo a lo esperado para muestras de ARN puras con una razón $260/280 \text{ nm} \leq 2.1 \pm 0.1$. Otro de los parámetros evaluados correspondió a la integridad de ARN, la cual es clave en la preparación de librerías de secuenciación masiva, debido a que ARNm íntegros nos permiten obtener una óptima distribución de las lecturas a lo largo del transcrito y no solo concentradas en los extremos 3' UTR como ocurre al trabajar con ARN fragmentado. Se recomienda que como punto de partida, el ARN utilizado para preparación de librerías tenga siempre un RIN ≥ 8 . En nuestro trabajo, obtuvimos en promedio un RIN de $9,5 \pm 0,4$, y en general este parámetro de calidad fue bastante homogéneo dentro de una misma serie de tiempo. Considerando que el RIN puede tener un valor entre 1 – 10, 1 para ARN degradado y 10 ARN integro, nuestras muestras de ARN tuvieron una excelente calidad. Sin embargo, no nos fue posible determinar el RIN en 16 de las 108 muestras preparadas, 15 de estas corresponden a los ensayos piloto (S1 y S2), donde debido a los bajos rendimiento debimos priorizar por la preparación de las muestras, no obstante, pudimos medir el RIN en 5 de las 20 muestras de estas series obteniendo un valor promedio de 10. Debido a que estas muestras fueron preparadas en paralelo, y en general los valores de RIN fueron constantes dentro de las series de tiempo, inferimos que el valor de integridad debiese ser similar para las muestras donde no fue posible determinarlo. Respecto a la muestra 11h-sham de la serie S4 a la cual tampoco pudimos medir el RIN, los atribuimos principalmente a los problemas técnicos midiendo la integridad en esta serie, ya que el rendimiento de esta muestra fue de $4,2 \mu\text{g}$. También una de las muestras de la serie S4 tuvo un RIN de 7,4 (12h-transectada), inferior a lo

recomendado. No obstante, de igual manera decidimos preparar su librería, obteniendo porcentajes de mapeo similares al resto de las librerías (72,8% respecto a un promedio de 69,1%) y una buena correlación respecto a un replicado biológico de la serie S5 (0.98) (**Fig. 8**)

La calidad de las secuenciaciones fue de acuerdo a lo esperado, el 95.9% de las lecturas reportó un promedio de calidad (Sequence Quality Score) ≥ 30 , lo cual fue superior a la calidad obtenida en secuenciaciones previa de nuestro laboratorio, las cuales posterior a un recorte de sus extremos reportaron un valor promedio de calidad ≥ 30 en el 90% de las lecturas [Lee-Liu et al., 2014]. Posiblemente, esta buena calidad en las secuenciaciones se debe a que la encargada de preparar nuestras librerías tenía una amplia experiencia en la preparación de librerías de RNA-seq de *Xenopus* y que además la unidad de secuenciación también tenía experiencia en muestras de este tipo. Por otra parte, esto pone en manifiesto los altísimos estándares de calidad con los cuales trabaja la unidad de secuenciación del Francis Crick Institute.

Respecto al mapeo de nuestras lecturas, logramos un 69.1 % de lecturas mapeadas respecto al 27% que se había logrado en trabajos previos de nuestro laboratorio [Lee-Liu et al., 2014]. Esta diferencia puede deberse en parte a la calidad de nuestras secuenciaciones, pero mayoritariamente a que los datos del genoma y transcriptoma de *X. laevis* han mejorado mucho en los últimos 5 años [Session et al., 2016], sin embargo, aún es necesario seguir mejorándolos. Siempre hemos pensado que nuestros datos pueden ser claves en el mejoramiento de la caracterización del transcriptoma de *Xenopus* debido a que corresponden a estadios más tardíos de los que se acostumbra a utilizar para este modelo, el cual ha sido usado mayoritariamente como un modelo de desarrollo temprano. Si bien, nosotros intentamos

hacernos parte de esta tarea durante los primeros años de esta tesis, nos dimos cuenta de las dificultades de este proyecto debido a la naturaleza pseudo-tetraploide de *X. laevis*, por lo cual nos hubiese tomado más tiempo del que teníamos disponible y hubiésemos tenido que acotar este trabajo solo a un ensamblaje de transcriptoma y posterior análisis bioinformático de este, sin el tiempo suficiente para pasar a pruebas funcionales de genes o vías de señalización importantes en el inicio del proceso de regeneración de la médula espinal. Apoyando estas afirmaciones, en la **Figura 30** se muestra la validación del transcrito denominado *asmb1_27531*, el cual fue obtenido es nuestro ensamblaje de transcriptoma y aparentemente correspondería a un transcrito no codificante. Este transcrito es expresado solo en respuesta al daño a la médula espinal y aparentemente no es expresado durante el desarrollo (Unidad experimenta de John Rojas, datos no mostrados). Además, lo hemos secuenciado parcialmente para futuros análisis (Unidad experimental de Sinaid Martínez, datos no mostrados).

También respecto al mapeo, podemos destacar que logramos detectar con una o más lecturas el 95,8% de los transcritos primarios, lo cual nos sugiere que alcanzamos una buena profundidad en nuestras secuenciaciones, mientras el 67,2% de los transcritos totales fueron detectados de manera consistente, de acuerdo a nuestro criterio. Si bien el porcentaje disminuye bastante, los criterios utilizados fueron estrictos con el objetivo de filtrar aquellos genes de baja expresión.

Una vez finalizado el mapeo de las muestras piloto (S1 y S2), pudimos observar que existía una buena correlación entre los resultados de expresión génica obtenidos por qPCR y RNA-seq al comparar el perfil de expresión de *socs3* utilizando las mismas muestras de ARN. Este primer resultado, nos confirmó la factibilidad de utilizar los perfiles de expresión de alta

resolución temporal en un modelo de daño y además nos sugería que la metodología de RNA-seq mostraba una menor variabilidad en la cuantificación de la expresión génica.

Posteriormente, una vez terminada la etapa de secuenciación, procedimos a unir las diferentes series de tiempo observando que si bien algunos perfiles de expresión mantenían su continuidad a lo largo de las series de tiempo, había otros que no lograban una unión limpia entre las series y mostraban saltos en la continuidad. Respecto a los perfiles de expresión que mantienen su continuidad a lo largo de las 6 series de tiempo, estos nos permitieron comprobar que es posible utilizar la técnica de perfiles de alto resolución temporal en nuestro modelo utilizando varias series de tiempo, y además que habíamos logrado un muestreo sincronizado durante la ventana de tiempo estudiada. Por otra parte, esta discontinuidad en algunos perfiles de expresión, así como una buena correlación entre muestras de una misma serie de tiempo pero baja correlación respecto a replicados biológicos de otras series nos indicaba un claro efecto de lote en nuestros datos, lo cual era apoyado por el hecho de cada serie de tiempo había sido preparada con animales provenientes de diferentes fertilizaciones en un transcurso aproximado de un año.

Las discontinuidades en perfiles de expresión de alta resolución al unir datos provenientes de distintas fertilizaciones no es algo único de nuestro modelo de estudio, nuestros colaboradores observaron diferencias similares durante las primeras horas del desarrollo en *Xenopus tropicalis* cuando utilizaron dos series de tiempo provenientes de dos fertilizaciones distintas [Collart et al., 2014]. Ellos también observaron estas discontinuidades para algunos genes en los puntos de solapamiento, notando que muestras provenientes de diferentes fertilizaciones pareciesen tener un mismo patrón cinético, pero con intensidades diferentes.

Ellos solucionaron estos problemas calculados un factor de normalización entre los puntos de solapamiento, lo cual les permitió normalizar ambas series y lograr una mejor unión de los datos. Sin embargo, este trabajo tiene 2 series de tiempo y una condición, respecto a nuestros datos que están compuestos de 3 condiciones con 6, 6 y 2 series de tiempo respectivamente, lo cual dificultaba utilizar esa metodología y es la razón por la que nos inclinamos a utilizar una corrección de efectos de lote utilizando SVA-Combat. Esta metodología pudo lidiar de manera satisfactoria con nuestros datos, lo cual fue comprobado con un acercamiento en las medidas de correlación para los replicados biológicos, así como también por una mejoría en la continuidad de los perfiles de expresión después de aplicar la remoción de efectos de lote.

5.1.2 Análisis de expresión diferencial

Como primera etapa de este objetivo quisimos determinar cuáles era los genes que eran desplegados por un daño directo a la médula espinal, por lo cual comenzamos con análisis de expresión diferencial. Hasta el inicio de este trabajo, el uso de series de tiempo no era algo muy utilizado a nivel de transcriptómica, por ende, las herramientas estadísticas para analizar nuestros datos no eran abundantes, principalmente lo que se tenía a disposición para analizar expresión diferencial eran pruebas estadísticas que comparaban un punto temporal respecto a su control y para series de tiempo sin igual número de replicados por punto temporal era posible analizar expresión diferencial mediante una prueba de razón de verosimilitud (Likelihood Ratio Test, LRT) utilizando DESeq2. Durante este periodo, el laboratorio de nuestro colaborador en Inglaterra montó un sistema de análisis de expresión diferencial para series de tiempo utilizando Procesos Gaussianos [Owens et al., 2016]. Este fue de gran utilidad respecto al método que comenzamos utilizando (LRT, DESeq2), ya que el análisis por

Procesos Gaussianos mostró una mayor sensibilidad trabajando con nuestros datos, permitiéndonos identificar genes diferencialmente expresados que DESeq2 no podía detectar (Datos no mostrados).

De esta manera, identificamos 1850 genes diferencialmente expresados por un daño directo a la médula espinal, todos con un $BIC \geq 10$ en las dos comparaciones realizadas, transectado y *sham* y transectado y sin daño. El número de genes desplegados nos hace inferir que estamos frente a un proceso muy dinámico, considerando que utilizamos un umbral de corte alto ($BIC \geq 10$), no consideramos a aquellos genes con valores de BIC entre 2 – 10, los cuales también podrían ser definidos como diferencialmente expresados. Este umbral de corte lo establecimos con el objetivo de seleccionar a los genes que estuviesen involucrados en los procesos desplegados con mayor intensidad.

5.2 Realización de análisis bioinformáticos para identificar posibles genes o vías de señalización involucrados en la regeneración de la médula espinal y validar sus cambios mediante técnicas de biología molecular.

5.2.1 Estructuración modular de los cambios tempranos del transcriptoma

Mediante el análisis de correlación ponderada comprobamos que era posible estructurar a nivel modular los genes diferencialmente expresados, observando que estos son activados de una manera temprana y dinámica, y que se organizan en 11 diferentes módulos de co-expresión, 3 módulos regulados negativamente y otros 8 regulados positivamente. Además, fue posible identificar una temporalidad respecto a la activación de los módulos regulados positivamente, pudiendo clasificarlos como tempranos, intermedios o tardíos según

alcanzaban sus máximos de expresión, reafirmando la buena elección del método de agrupamiento utilizado. También, nuestros resultados sugieren que esta respuesta es activada de manera gradual y progresiva debido a que el número de genes en los módulos aumenta consecutivamente en las distintas oleadas.

Por otra parte, aparentemente hemos logrado una mayor resolución que otros trabajos sobre expresión temprana en regeneración, como el trabajo del equipo de Reddien [Wenemoser et al., 2012] donde identificaron solo genes regulados positivamente en respuesta al daño, los cuales fueron agrupados en dos oleadas transcripcionales. Sin embargo, es importante recordar que en este estudio realizado en planarias y utilizan microarreglos para evaluar la expresión génica.

5.2.2 Análisis de Enriquecimiento de Ontología Génica y Vías de Señalización KEGG

En este análisis encontramos términos de ontología génica enriquecidas en todos los módulos de co-expresión, así como en muchos casos enriquecimientos de vías de señalización KEGG que refuerzan los resultados de ontología génica. De esta manera, pudimos comprobar una vez más que genes asociados a una misma función biológica tienden a expresarse coordinadamente [Singer et al., 2004, McCarroll et al., 2004, van Dam et al., 2017].

Como la literatura nos sugería, los primeros genes en ser desplegados luego de un DME (módulo E1) correspondían en su mayoría a GTIs y en un gran porcentaje a factores de transcripción, lo cual es coherente con la función de remodeladores de la maquinaria celular que ha sido asociada a los GTIs. Posteriormente en el módulo E2 observamos una serie de procesos asociados con la infiltración de células sanguíneas, destacando la migración de células del sistema inmune y el proceso de coagulación, el cual es necesario para detener la

hemorragia producida por la transección. Luego, en el módulo I1 el cual se activa ligeramente después del módulo E2, pero que se mantiene encendido por toda la ventana de observación, estaría enriquecido en genes asociados a migración celular (señalización mediada por integrinas, regulación de quimiotaxis, regulación de despolarización de filamentos de actina), es posible que esté estrechamente relacionado a los procesos iniciados en E2, específicamente migración de células del sistema inmune debido a que también se observa un enriquecimiento de genes asociados a fagocitosis. Sin embargo, no debemos descartar que parte de estos procesos de migración celular estén asociados a la migración de progenitores neurales hacia la zona de la lesión. Los módulos que se activan posteriormente podrían tener una directa relación con la activación de células troncales neurales, ya que los módulos I2, I3 y L1 tienen un fuerte componente asociado a biogénesis de ribosomas, lo que tendría como consecuencia un aumento en la síntesis de proteínas, uno de los primeros pasos en la activación de células troncales neurales. Esta inferencia puede ser reforzada porque los siguientes módulos en activarse muestran un enriquecimiento en genes asociados a proliferación de células troncales (L2) y replicación del ADN (L3).

Respecto a los módulos regulados negativamente, observamos una fuerte asociación a la vía de señalización mTOR, observando una disminución en la expresión de varios reguladores negativos de esta vía en el módulo D1. Esto es complementado por una disminución en la expresión de genes asociados a autofagia, un proceso biológico directamente regulado por esta vía de señalización.

De esta manera, nuestro análisis transcriptómico aparentemente nos habría permitido abarcar la serie de eventos que son desencadenados desde el momento de la lesión en la

médula espinal hasta la activación de las células troncales neurales, que como hemos visto en trabajos previos de nuestro laboratorio serían claves en la regeneración de este tejido [Muñoz et al., 2015].

5.2.3 Integración de resultados e identificación de blancos de estudio

En la siguiente sección discutiremos de manera integrada nuestros resultados con el objetivo de identificar genes o vías de señalización que puedan ser claves durante la regeneración de la médula espinal.

5.2.3.1 Genes Temprano Inmediatos (GTIs, Módulo E1)

Respecto a los módulos identificados, pudimos notar que E1 está compuesto en un 48% por genes descritos previamente como Genes Temprano-Inmediatos (GTIs), los cuales corresponden a los primeros respondedores frente a una amplia variedad de estímulos [Healy et al., 2013]. En nuestra investigación no nos es posible afirmar que estos correspondan a GTIs, debido a que por definición entran en esta categoría solo aquellos genes que no necesitan de síntesis de proteínas para comenzar su transcripción y en nuestro caso no realizamos ensayos con cicloheximida para bloquear la traducción, y así chequear que su despliegue transcripcional fuese independiente de la síntesis de nuevas proteínas [Tullai et al., 2007; Bahrami y Drabløs, 2016]. Por otra parte, este módulo tiene un alto porcentaje de factores de transcripción lo cual ha sido asociado previamente a la respuesta temprana inmediata, a la cual se le atribuye la función de remodelar la maquinaria celular para desplegar una respuesta específica frente al estímulo generado [Bahrami y Drabløs, 2016]. En base a esto, nuestra primera interrogante fue **¿Qué vía de señalización está encendiendo a los genes de expresión temprana inmediata en nuestro modelo?**

- Vía de señalización TNF

Intentando responder la pregunta antes formulada, en el módulo E1 observamos la activación de 7 blancos transcripcionales de la vía señalización del factor de necrosis tumoral (TNF), los genes *fos*, *jun*, *junb*, *vegfc*, *ptgs2*, *nfkbia*, *socs3*, además en otros módulos es posible observa la activación de otros dos blancos transcripcionales de esta vía *lif* y *tnfaip3*. En regeneración de hígado en ratón se ha observado que una temprana activación de la vía TNF sería necesaria para iniciar la proliferación de los hepatocitos. En este modelo el aumento en la expresión de interleuquina 6 (IL-6), un blanco transcripcional de la vía TNF, produciría la activación de la vía JAK-STAT, dando como resultado la adquisición de competencias proliferativas por parte de los hepatocitos [Yamada et al., 1997]. Además, en este trabajo, ellos también observan aumentos de los mensajeros de *fos*, *jun* y *junb* entre 0.5 - 1 hora post-lesión.

Si efectivamente la vía de señalización TNF fuese quien activa la regeneración de la médula espinal de *Xenopus*, nuestros análisis bioinformáticos no nos permiten determinar cuál sería el ligando activador ni su origen. En el caso del hígado los macrófagos hepáticos (células Kupffer) son unas de las principales fuentes de TNF- α [Tao et al., 2017]. Siguiendo con esta línea, en regeneración de médula espinal de pez cebra, se ha observado una activación transitoria de la vía TNF inducida por la secreción de TNF- α desde macrófagos que llegan a la zona de la lesión después de la primera hora. Esta activación ayudaría en la formación de puentes gliales, los cuales son correlacionados con la recuperación de la capacidad de nado en estos animales [Tsarouchas et al., 2018]. Si los tiempos de respuesta en pez cebra y *Xenopus* fuesen similares, esta llegada de macrófagos es ligeramente posterior a la activación que observamos en los blancos transcripcionales de la vía TNF. En este trabajo también se

menciona que algunas neuronas y neutrófilos, los cuales comienzan a llegar a la zona de la lesión antes que los macrófagos, también son TNF- α positivos aunque en menor medida que los macrófagos. De esta manera, pensamos que alguno de estos dos últimos podrían ser los responsables de la activación temprana de la vía TNF en nuestro modelo, pudiendo ser el origen de TNF- α que estamos buscando, sin embargo, es necesario comprobarlo experimentalmente.

- **Vía de señalización MAPK**

De esta manera, la ausencia de cambios en la expresión de un ligando de la vía TNF nos lleva a buscar otras alternativas para la vía de señalización que inicia y/o coordina nuestro proceso de estudio. Dentro de nuestros análisis observamos también un enriquecimiento en 6 componentes de la vía de señalización MAPK en el módulo E1 y son 33 los miembros que en total estarían cambiando su expresión en la ventana de tiempo estudiada. Esta vía ha sido previamente asociada a otros modelos de regeneración como corazón en pez zebra, cabeza en hidra, nervio ciático en ratón [Liu y Zhong, 2017; Missinato et al., 2018; Chera et al., 2011; Kato et al., 2013]. Además, ha sido relacionada con la expresión de genes de expresión temprana inmediata y puede responder a pulsos de Ca^{2+} y ROS, dos señales tempranas identificadas en regeneración de cola en *Xenopus* y ajolote [White y Sacks, 2010; Sato et al., 2014, Bigarella et al., 2014].

En regeneración de cola en *Xenopus laevis* en estadios 37 – 39 se observó un aumento de pulsos de Ca^{2+} durante las primeras 24 horas luego de la amputación, los cuales al ser inhibidos bloquean la regeneración de la cola. Si bien este estudio está abocado al estudio de células musculares, el bloqueo de estos pulsos de Ca^{2+} también impide la regeneración del

resto de los tejidos de la cola, entre los que se encuentra la médula espinal. En este trabajo se menciona que la vía de señalización ras/raf/MEK/MAPK juega un rol crítico en la regeneración muscular y que activadores de esta vía incluyen la despolarización de membrana y la entrada de Ca^{2+} [Tu y Borodinsky, 2014]. Los autores explican estos eventos como una recapitulación de oleadas de Ca^{2+} de etapas tempranas del desarrollo, entre los que podemos destacar la propagación de pulsos de Ca^{2+} que ocurre en las glías radiales de la zona ventricular cortical en ratón entre E12 y E16, los cuales coinciden con un incremento en los niveles de neurogénesis [Weissman et al., 2004]. En nuestro modelo, hemos visto un fuerte aumento en la expresión del canal de Ca^{2+} CACNG5 (BIC trans-vs-sham: 99,18) en el módulo II. Al parecer CACNG5 regula de manera muy fina la vía MAPK, ya que se ha observado que en epéndimo de médula espinal su expresión se ve disminuida por acción del *lncRNA* LINC00880, lo cual promueve la proliferación celular, migración, invasión e inhibición de la apoptosis en las células tumorales [Wu et al., 2018].

También se ha reportado un aumento temprano de ROS en regeneración de cola de anfibios urodelos y anuros. En regeneración de cola de ajolotes en estadio 42 se ha observado un aumento de ROS en los tres principales ejes estructurales de la cola: médula espinal, notocordio y músculo esquelético. Este aumento puede ser detectado incluso a los 10 minutos después de la amputación y es mantenido durante las siguientes 24 horas, cayendo a niveles basales después de este periodo [Al Haj Baddar et al., 2019]. Por otra parte, en regeneración de cola de *Xenopus laevis* estadios 41 – 47 se observa un ligero aumento de ROS a los 8 minutos (Primera medición reportada por los investigadores), sin embargo, en este modelo el aumento se observa de manera más progresivo en el tiempo y se extiende por varios días, durante gran parte del proceso de regeneración de la cola. También observan una sostenida

activación de la vía Wnt/ β -catenina a las 24 horas, la cual se ve disminuida al utilizar un inhibidor de la producción de ROS [Love et al., 2013]. En nuestro modelo, nosotros también observamos un aumento de ligandos Wnt (*wnt5a.S*: I1, *wnt5a.L*: L1, *wnt7b.L*: L2, *wnt11.S*: L3), pero estos mayoritariamente son observados en módulos tardíos, lo cual nos sugiere que existiría un actor desconocido entre el aumento de ROS y la activación transcripcional de los ligandos de la vía Wnt/ β -catenina.

Respecto a los miembros de la vía MAPK que hemos visto diferencialmente expresados, podemos resaltar al ARNm de *nur77*, un factor de transcripción que actúa como efector de esta vía y el cual se activa tempranamente. También vemos aumentos en la expresión para 4 homólogos de la familia de las GTPasas Ras, *loc100496446* o *rras* con un BIC = 29.57, *rassf7* o *hras1* con un BIC = 78.26, *rras* con un BIC = 64.04, *rras* con un BIC = 54.90, todos agrupados en el módulo I1, y *rras* con un BIC = 14.00 en el módulo L1. Estos actúan como reguladores dentro de la vía MAPK. En la literatura se ha reportado que RASSF7, uno de los homólogos con mayores cambios en su expresión, junto a NRAS podrían constituir un mecanismo temporal de regulación de la apoptosis frente a una señal de estrés. RASSF7/NRAS promueven la supervivencia mediante la inhibición de la vía MKK7/JNK. Sin embargo, si la señal de estrés se prolonga en el tiempo, RASSF7 es degradado y la señal de muerte celular procede [Takahashi et al., 2011]. Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de *rras*, otro de los homólogos con mayores cambios, en fibroblastos quiescentes puede estimular la progresión del ciclo celular a través de G1 y posterior replicación del ADN. Sin embargo, estas acciones serían independientes de ERK/JNK/p38 por lo que se sugiere que tendría una señalización río abajo distinta a otros homólogos de RAS. Este mismo trabajo también sugiere que RRAS podría tener algún rol en la activación de integrinas ya que su

activación en células PC12 causa la formación de extensas proyecciones celulares [Self et al., 2011]. Asimismo, en zebrafish se ha reportado que RRAS participaría en la formación del tubo neural, cuando animales fueron tratados con morfolidos para rras tuvieron una duplicación del canal central de la médula espinal [Ohata et al., 2018].

De esta manera, hemos resumido evidencia que infiere que dos señales activadoras de la vía MAPK, como lo son Ca^{2+} y ROS, podrían ser desplegadas tempranamente luego de un daño a la médula espinal, estos sumado a la participación de esta vía en procesos como proliferación y desarrollo del tubo neural. Además, basados en investigaciones que la relacionan al encendido de GTIs y la ausencia de un ligando para la vía TNF, no podríamos descartar la posibilidad de que sea esta la vía encargada de encender el programa regenerativo o que este colaborando estrechamente con la señalización de la vía TNF, ya que es conocido el nivel de interconexión que tienen ambas.

5.2.3.2 Regulación de la vía de señalización JAK/STAT

Como mencionamos previamente, la activación de la vía JAK/STAT es fundamental para inicio de la proliferación de los hepatocitos luego de una hepatectomía. En nuestro modelo nosotros observamos elevados niveles de p-STAT3 a las 3 horas en animales estadio-R, los cuales se mantienen hasta 2 dpt, a diferencia de animales st66 donde los niveles más altos de p-STAT3 se registran entre 2 – 30 dpt [Tapia et al., 2017]. Esta activación de STAT3 sería similar a lo observado en regeneración de hígado donde se observa que la unión de este factor de transcripción al ADN aumenta progresivamente entre las 2-4 horas luego de la hepatectomía. Si bien en el trabajo de Yamada et al. (2014) ellos observan que la citoquina IL-6, regulada transcripcionalmente por la vía TNF, sería la encargada de encender la vía JAK-

STAT, nosotros no observamos cambios en el ARNm de este gen. Sin embargo, observamos un aumento significativo para *lif*, otra citoquina de la familia de las IL-6 y la cual es también regulada transcripcionalmente por la vía TNF. Pensamos que esta podría estar actuando como ligando para encender la vía JAK-STAT en nuestro modelo.

Si bien no vemos cambios en otra citoquina de la familia de IL-6 además de *lif*, nosotros observamos fuertes cambios transcripcionales para CRLF1 (también llamado CLF1, BIC transectado-vs-sham: 105,29) un compañero fisiológico de la familia de las IL-6 (**Tabla 5.2.4**). Experimentalmente, se ha demostrado que CLF1 puede interactuar con CLC una citoquina de esta familia, promoviendo su secreción. CLC tiene la capacidad de asociarse por sí solo al receptor CNTFR, sin embargo, se ha observado que la interacción de ambos (CLF1/CLC) sería crítica para que CLC puede asociarse a otro receptor, LIFR β . También se ha visto que CLF1 puede asociarse a la subunidad p28 de IL27, formando una nueva citoquina compuesta, la cual puede unirse a un receptor tripartito compuesto de IL-6R α , WSX-1 y gp130. En cuanto a su regulación transcripcional, la expresión de CLF1 puede ser inducida por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IFN- γ . Por otra parte, durante el desarrollo se ha observado una disminución de motoneuronas en la región lumbar de la médula espinal en ratones a los cuales se les ha delecionado este gen [Kass, 2011]. De esta manera, existe la posibilidad de que esta proteína pueda estar ayudando en la señalización de *lif* por algún mecanismo no descrito hasta ahora y/o que pudiese estar contribuyendo a la secreción de otra citoquina, la cual si bien no tiene cambios en su expresión, requiera de esta interacción para su secreción.

De esta manera, estos antecedentes nos sugieren otros mecanismos mediante los cuales podría estar siendo regulada la vía JAK/STAT en nuestro modelo, sin embargo, es necesario comprobarlo de manera experimental.

5.2.3.3 Vía de señalización mTOR

Respecto al sistema nervioso central, se sabe que la regulación de la vía mTOR sería clave tanto en el mantenimiento, activación y proliferación y diferenciación de progenitores neurales. Se ha reportado que una disminución de la actividad de mTOR por parte de PTEN sería necesaria en el mantenimiento de células troncales neurales quiescentes y que un aumento en su actividad sería relacionado a la activación, proliferación y diferenciación de las células troncales neurales. Sin embargo, la regulación fina de esta vía durante estos procesos aún no se comprende del todo, por ejemplo aún no se conocen los reguladores río arriba de mTOR durante la transición de NSC quiescentes a NSC activadas [Baser et al., 2017; Meng et al., 2018].

Nuestros análisis bioinformáticos indicaban una posible activación de la vía mTOR, aparentemente promoviendo un aumento en los niveles de síntesis de proteína y una disminución del flujo autofágico. Experimentalmente pudimos comprobar un aumento en la fosforilación de S6, blanco de RPS6KB1, y 4E-BP1, dos efectores de la vía mTOR a través de los cuales se regulan la biogénesis de ribosomas y síntesis de proteína y la traducción cap-dependiente, respectivamente. Previamente se ha reportado que la activación progresiva de células troncales neurales es acompañada de un aumento global de la síntesis de proteínas [Llorens-Bobadilla et al., 2015].

mTOR puede regular la traducción cap-dependiente a través del complejo EIF4F. En nuestro RNA-seq vimos un aumento en los mensajeros que codifican para las 3 subunidades de este complejo (EIF4E, EIF4G3 y EIF4A1), los cuales se ha visto que en células NIH3T3 serían regulados transcripcionalmente por c-Myc [Lin et al., 2008], uno de los factores de transcripción que están diferencialmente expresados en nuestro trabajo. El complejo EIF4F promueve la traducción de ciertos ARNm mediante el reconocimiento de estructuras secundarias en su región 5' UTR por EIF4E, las cuales son desenrolladas por la helicasa EIF4A favoreciendo su interacción con el complejo de pre-iniciación 43S [Baser et al., 2017]. Bajo esta misma línea, se sabe que un aumento en la traducción mediado por mTOR sería clave en regeneración de hígado en ratón, donde posterior a la hepatectomía se observa un aumento en la fosforilación mTOR-dependiente de 4E-BP1, lo cual promovería la liberación de EIF4E favoreciendo la formación del complejo EIF4F [Goggin et al., 2004].

Se ha reportado que en NSC quiescentes muchos ARNm que codifican para proteínas pro-neurogénicas como neurod1, neurod4, neurogenina1, neurogenina2 estarían unidos a EIF4E, el cual estaría asociado con el regulador negativo de la traducción 4E-T, y esta asociación promovería la acumulación de estos ARNm en cuerpos P. Por ende, no producirían ninguna proteína, pero podrían ser traducidos rápidamente frente al estímulo adecuado [Yang et al., 2014]. Adicionalmente, se ha reportado que en cerebro de ratón la disminución en el número de NSC asociado a la edad estaría acompañada por una similar caída en la actividad de mTORC1, y prolongar la estimulación de mTORC1 con ketamina pospondría este decline de las NSC asociado a la edad [Baser et al., 2017].

Continuando con los procesos biológicos en que podría estar relacionada la vía mTOR, nuestros datos muestran un fuerte enriquecimiento en genes asociados a biogénesis de ribosomas, y muchos de ellos han sido asociados en estudios previos a la mantención de la pluripotencia de células troncales [Brombin et al., 2015]. Esta observación podría estar directamente relacionada al aumento que observamos en la expresión de *rps6kb1*, un efecto de la vía mTOR asociado a biogénesis de ribosomas [Chauvin et al., 2014]. Además, otros estudios han reportado que un aumento en la transcripción de ARNr y/o proteínas ribosomales, a menudo ha sido relacionado a células troncales en un estado proliferativo [Baser et al., 2017]. Estudios previos sobre activación de progenitores neurales en ratón, identificaron una alta tasa de transcripción de genes asociados a biogénesis de ribosomas durante la transición de células troncales neurales desde un estado quiescente a uno activado [Llorens-Bobadilla et al., 2015].

Por otra parte, respecto a la disminución en la expresión de genes asociados a autofagia, a la fecha no hemos comprobado experimentalmente si este proceso biológico se ve alterado en nuestro modelo. Sin embargo, estudios previos indican que el sistema lisosoma-autofagia es clave para la eliminación de agregados de proteínas en NSC quiescentes lo cual sería crucial para la posterior activación de éstas [Leeman et al., 2018].

Resumiendo, inferimos que en nuestro modelo mTOR podría ser clave durante la activación de los progenitores neurales del canal central de la médula espinal, principalmente regulando la síntesis de proteínas. Basado en los antecedentes anteriores, especulamos que esta vía estaría regulando la traducción de proteínas pro-neurogénicas, entre estas el factor de transcripción SOX2, cuya traducción según ha sido reportado sería regulada por EIF4E [Ge et al., 2010]. Previamente, nuestro laboratorio ha reportado que este factor de transcripción es

clave para la proliferación de los progenitores neurales la médula espinal luego de un daño y la consecuente recuperación de la capacidad de nado [Muñoz et al., 2015].

De esta manera en nuestro laboratorio se procedió a validar la activación de esta vía de señalización por WB (Trabajo de Claudia Parra, Apéndice 10). Como resultados de esta prueba, el temprano y sostenido aumento en la fosforilación de S6 (Aumento de niveles a 3 hpt) observado nos sugería que podría estar jugando un importante rol en encender los eventos posteriores. En base a estos antecedentes experimentales decidimos avanzar con la vía mTOR para evaluar un importancia en la regeneración de la médula espinal mediante pruebas funcionales.

Finalmente, respecto a que podría estar encendiendo a la vía mTOR, nuestros resultados bioinformáticos muestran un aumento en componentes de las vías de señalización MAPK y PI3K/Akt, con 33 y 41 respectivamente en la ventana de observación (Apéndice 9). Ambas vías tienen una estrecha relación con la vía mTOR y se ha reportado que son capaces de activarla. Futuros estudios son necesarios para comprobar esta hipótesis.

5.2.3.4 Mantención de la pluripotencia en células troncales neurales

En el módulo L2 observamos un fuerte enriquecimiento de genes asociados términos relativos a células troncales (división de células troncales y proliferación de células troncales), así como también en miembros de la vía de señalización de mantención de la pluripotencia de células troncales. Además, encontramos un enriquecimiento en genes asociados al termino ontológico desarrollo de célula epitelial columnar/cuboidal, el cual corresponde al tipo de epitelio presente en el canal central de la médula espinal. Estos enriquecimientos, nos hace pensar que este módulo podría ser clave en la regeneración de la médula espinal.

Lo anterior es reforzado por un enriquecimiento en los promotores proximales del módulo L2 para la secuencia de unión al ADN de Hes1. En total hemos observado cambios en la expresión de tres factores de transcripción de la familia Hes, *hes1* (E1), *hes3* (L3) y *hes5* (D1). Según la literatura, un triple mutante en ratón (*hes1*^{-/-}/*hes3*^{-/-}/*hes5*^{-/-}) comprobó que en conjunto estos tres FT serían esenciales para el mantenimiento de la glía radial, y que en su ausencia éstas serían diferenciadas prematuramente a neuronas, generando defectos en la formación de la médula espinal. También se observó que existiría algún grado de compensación entre *hes1* y *hes5* cuando uno de los dos es delecionado (^{-/-}) [Hatakeyama et al., 2004]. Estos antecedentes nos sugieren la importancia que podrían tener estos factores de transcripción en la regeneración de la médula espinal, y explicar en parte porque vemos un aumento en la expresión de *hes1* y *hes3*, mientras apreciamos una caída en el ARNm de *hes5*. Por otra parte, niveles altos de Hes1 han sido asociados con quiescencia en células troncales neurales, mientras niveles menores y una alternancia oscilatoria entre Hes1 y Ascl1 (Regulado negativamente por HES1) son asociados a células troncales neurales activas. Por otra parte, altos niveles de ASCL1 y baja expresión de HES1 son asociados a neurogénesis y depleción de células troncales neurales [Sueda et al., 2019].

De esta manera, nuestros resultados nos sugieren la importancia del módulo L2 en la regeneración de la médula espinal principalmente por su enriquecimiento en genes asociados a progenitores neurales, por otra parte bioinformáticamente hemos deducido que este módulo podría ser regulado transcripcionalmente por Hes1, lo cual sería interesante de comprobar experimentalmente.

5.2.3.5 Smad3 y la vía TGF- β

Diversos resultados bioinformáticos sugerían a Smad3 como un potente candidato a regulador de la regeneración de la médula espinal, era el factor de transcripción más interconectado en la red de interacción proteína – proteína de factores de transcripción, y además se identificó un enriquecimiento para su secuencia de unión al ADN en los promotores proximales de los módulos I3, L1 y L2.

Según literatura, previamente se había establecido a Smad3 como un factor de transcripción pro-fibrótico en modelos de daño [Stramer et al., 2005, Latella et al., 2009, Zhang et al., 2016]. Sin embargo, estudios recientes mediante ChIP-seq muestran una divergencia en los sitios de unión para los factores de transcripción Smad2 y Smad3, los cuales previamente habían sido mayoritariamente asociados a una función conjunta. Mientras Smad2 es requerido en la diferenciación de las tres capas germinales desde células troncales embrionarias, Smad3 sería necesario para una especificación neural normal [Liu et al., 2016]. Además, se ha demostrado la participación activa de Smad3 en el desarrollo de la médula espinal de pez cebra [Casari et al., 2014]. Por esta razón, basados en nuestros resultados y en antecedentes recopilados de la literatura elegimos a Smad3 como uno de nuestros candidatos.

En una primera etapa validamos los cambios en la expresión de *smad3* e *inhba*, un ligando de la vía TGF- β . Mientras *smad3* mostró una mayor dispersión de datos y fue posible validar una expresión diferencial solo a las 6 horas, *inhba* reportó cambios significativos a 4, 6 y 9 hpt. Esto lo atribuimos principalmente a las variaciones entre fertilizaciones y que las cuantificaciones por pPCR presentan una mayor variabilidad que técnicas como el RNA-seq. Finalmente, consideramos que esta validación, nuestros análisis bioinformáticos y los datos

recopilados en literatura eran suficientes para analizar más a fondo el rol de Smad3 en la regeneración de la médula espinal.

En la **Figura 43** presentamos un resumen con las principales vías de señalización identificadas tempranamente y desarrolladas en la **Sección 5.2.3**. Proponemos algunas interacciones y componentes que creemos podrían ser clave para activar a los progenitores neurales de la zona ependimaria del canal central, y en consecuencia iniciar el proceso de regeneración de la médula espinal.

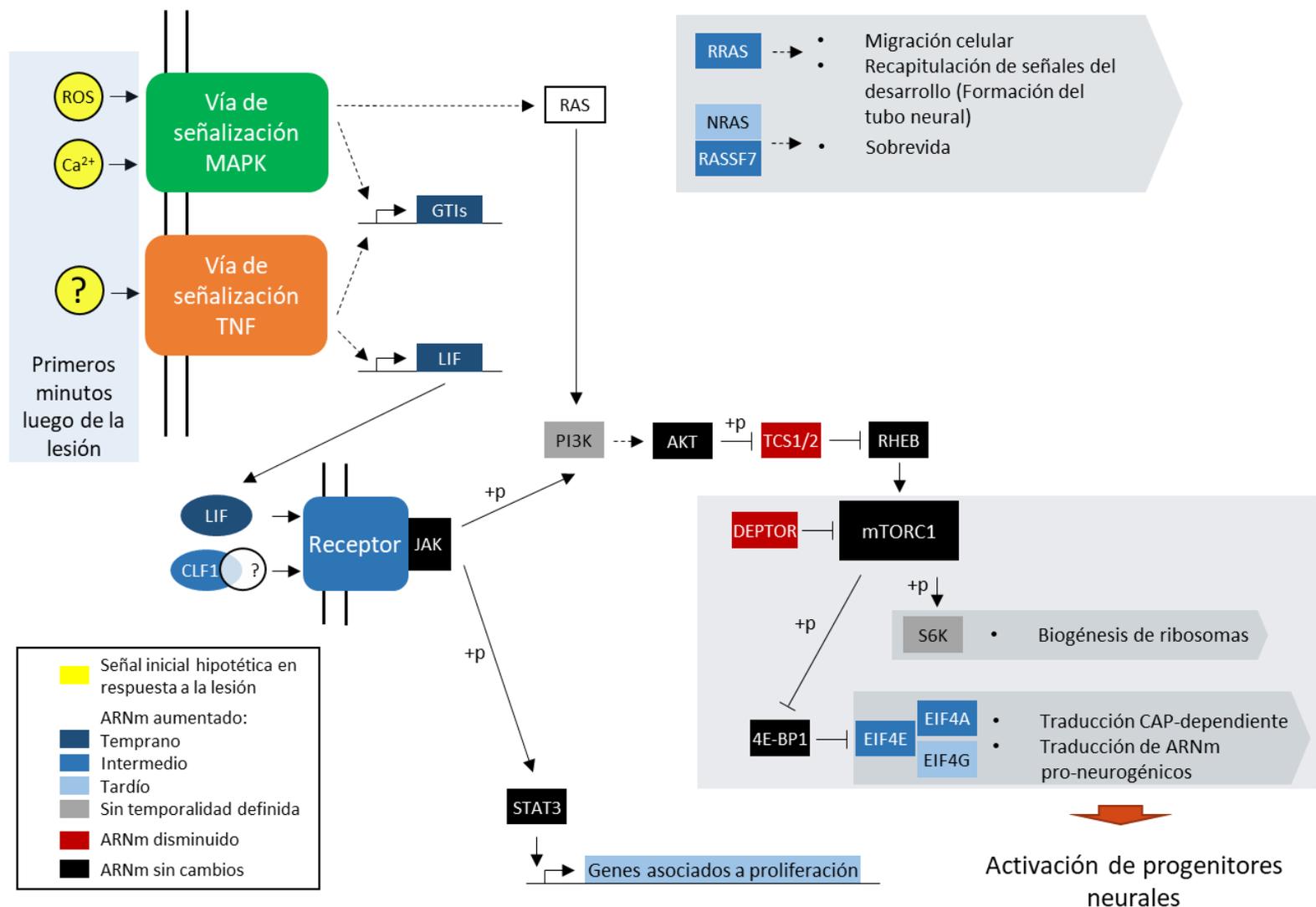


Figura 43. Esquema resumen de señalización temprana en la regeneración de la médula espinal. Se presentan las principales vías de señalización y componentes de estas que se infiere que podrían ser claves en el inicio de la regeneración de la médula espinal.

5.3 Determinación la función de genes y/o vías de señalización en el proceso de regeneración de la médula espinal

5.3.1 SMAD3 y la vía TGF- β

Posterior a las validaciones por qPCR, procedimos a evaluar los niveles de la proteína, en una primera etapa por WB (datos no mostrados), donde los niveles totales de Smad3 aparentemente no cambiaban en el tiempo, sin embargo, el anticuerpo contra p-Smad3 no funcionó en WB por lo cual desistimos de continuar usando esta metodología. Los problemas con anticuerpos son algo frecuente en nuestro modelo de trabajo, en general estos anticuerpos son hechos para modelos mamíferos, lo cual no aseguro que puedan funcionar en proteínas de *X. laevis* debido una menor similitud de secuencia en algunas ocasiones. Posteriormente al evaluar los niveles de p-Smad3 por IFI, aparentemente observamos una señal dependiente de daño en un gran porcentaje de células de la médula con una mayor tendencia a la zona caudal, sin embargo, no nos fue posible reproducir estos resultados. Por otra parte, en estos experimentos siempre observamos una localización citoplasmática, lo cual es contradictorio para la localización que esperaríamos ver en un factor de transcripción activo.

Para complementar los análisis anteriores, decidimos utilizar un reportero de la actividad transcripcional de Smad3 (12xCAGA-CMV::nls-mCherry), para lo cual hicimos co-electroporaciones de este y un control de electroporación (CAG::eGFP). Los resultados de este ensayo no mostraron diferencias entre animales sham y transectados. Si bien todos estos ensayos ensayo tuvieron un $n = 1$, ambas observaciones, localización citoplasmática y ausencia de cambios en la actividad transcripcional entre condiciones transectado y sham nos sugerían que Smad3 no tendría una participación activa en la regeneración de la médula espinal, no por lo menos durante las primeras horas. Sin embargo, no es posible afirmarlo

completamente mientras no utilizemos anticuerpos específicos para *Xenopus*, incluso tal vez una línea transgénica del reportero de Smad3 para descartar la variabilidad presente en los ensayos de electroporación.

5.3.2 Vía de señalización mTOR

Como mencionamos previamente observamos una disminución en varios reguladores negativos de esta vía y basados en los antecedentes previamente detallados suponíamos que podría tener un rol importante en la regeneración de la médula espinal. Nuestros primeros ensayos por WB e IFI inmediatamente indicaron que la vía estaba siendo activada tempranamente luego de la lesión y que aparentemente estaría regulando la síntesis de proteínas, biogénesis de ribosomas (p-S6) y traducción cap-dependiente (p-4E-BP1).

En nuestros análisis por IFI observamos principalmente un aumento en la fosforilación de S6 en células más externas de la médula, alejadas del canal central. De acuerdo a la localización de estas células pensamos que podrían corresponder a neuronas, sin embargo, no pudimos comprobarlo con una doble marcación con algún antígeno como NeuN, debido a que ambos anticuerpos presentes en nuestro laboratorio fueron fabricados en conejo. Por otra parte, comprobamos que algunas de estas células corresponderían a motoneuronas ya que observamos doble marcación en células islet-1 positivas. Relacionado a estas observaciones, previamente se ha reportado que una reactivación de la vía mTOR por una delección de PTEN, un regulador negativo de la vía mTOR, favorecería la regeneración axonal [Park et al., 2008]. Posteriormente, el mismo grupo observó una robusta y sostenida regeneración axonal luego de la co-delección de PTEN y SOCS3, reguladores negativos de las vías mTOR y JAK/STAT, respectivamente, sugiriendo que ambas vías actuarían sinérgicamente para potenciar la

regeneración axonal [Sun et al., 2011]. Incluso en la búsqueda de tratamientos farmacológicos para el tratamiento de lesiones en el SNC, se ha observado que Bisperoxovanadium, un inhibidor de PTEN, tendría un efecto protector posterior a una lesión en la médula espinal [Walker et al., 2012].

También, nos pareció interesante el aumento de p-S6 en células progenitoras neurales cercanas a la zona del daño. Esta correspondería a una población acotada de progenitores neurales, que probablemente está respondiendo de una manera diferencial al resto de las células del canal central, y dada su proximidad a la lesión, podrían ser los principales actores en este proceso regenerativo. Futuros estudios son necesarios para comprobar esta hipótesis, sin embargo, apoyando esta hipótesis se ha reportado un aumento de p-S6 en NPCs en estado proliferativo luego de una lesión cerebral traumática, cuya proliferación es significativamente reducida luego de inducir una inhibición de mTORC1 con rapamicina [Wang et al., 2016]. También, en NPCs del giro dentado de ratas, luego de una delección de CSP- α , una co-chaperona de la familia de las Hsp40 (*heat shock protein-40*), se observó un aumento en los niveles de p-S6 asociado a una activación de la vía mTORC1, la cual tuvo como resultado un aumento en la proliferación de esta población de NPCs [Nieto-González et al., 2019]. Por otra parte, un aumento de p-4E-BP1 en progenitores neurales, podría ser asociado a la regulación de la traducción cap-dependiente, y previamente mencionamos que muchas proteínas pro-neurogénicas serían reguladas de esta manera. Esto sería concordante con la literatura, donde se ha reportado que un aumento en la represión de la actividad de 4E-BP1 por parte de mTORC1, es crítico para la auto-renovación y diferenciación de células troncales neurales [Hartman et al., 2013].

Nuestros resultados muestran una fuerte activación de la vía mTORC1, la cual nosotros atribuimos a una activación de NPCs, sin embargo, en la literatura se ha reportado que esta vía de señalización es finamente regulada durante las distintas etapas de la neurogénesis, participando en diferenciación y migración de NPCs, desarrollo de dendritas y maduración de neuronas [LiCausi y Hartman, 2018; Meng et al., 2018]. Además, se sugiere que su actividad también cambiaría durante los distintos estados de los NPCs, ya que si bien la estimulación de la vía mTORC1 sería necesaria para la activación de estos, sus niveles de actividad serían bajos durante estados de quiescencia para favorecer una regulación positiva de la autofagia, proceso celular postulado por algunos autores como vital para mantener la homeostasis celular durante su estado de quiescencia [Chen et al., 2018].

Sin lugar a dudas, uno de los resultados más relevantes de esta sección fue comprobar la importancia de la vía de señalización mTOR en la regeneración de la médula tras observar una disminución en la recuperación del nado luego de inhibir la vía con rapamicina durante las primeras 21 horas luego de la lesión. Si bien tenemos algunos resultados que nos sugerirían que mTORC1 está regulando la proliferación de las células del canal central, lo cual explicaría los resultados anteriores, es necesario seguir confirmando estas observaciones. Por otra parte, tampoco es conocido el mecanismo molecular por el cual la vía mTOR estaría participando en la regeneración de la médula espinal, por ahora inferimos que tal vez mTORC1 estaría regulando traduccionalmente proteínas pro-neurogénicas (entre ellas Sox2) en los progenitores neurales de la médula espinal, sin embargo, es necesario comprobarlo experimentalmente y es ahí donde deben apuntar futuras investigaciones. Sobre la regulación de Sox2 por parte de mTORC1, se ha reportado durante la transición de NPCs a neuroblastos en bulbo olfatorio de rata, que durante el estado de neuroblasto temprano Sox2 se traduciría de

manera menos eficiente, lo cual es correlacionado a una inhibición transitoria de la vía mTORC1 [Baser et al., 2019]. Por otra parte, también es necesario conocer en detalle los tiempos de activación y las poblaciones celulares en las cuales esta vía de señalización está siendo regulada, porque si bien en nuestro modelo vemos que su activación es necesaria para la regeneración, se ha visto que su activación en astrocitos de rata 3 días después de una lesión en la médula espinal, contribuiría a la formación de la cicatriz glial, y que una inhibición sobre-expresando PTEN mejoraría la recuperación funcional [Chen et al., 2016].

De esta manera en esta tesis hemos descrito por primera vez los cambios tempranos en el transcriptoma desplegados luego de un daño por transección en la medula espinal, los cuales pudieron ser ordenados de manera modular para ayudarnos a entender cuáles eran los procesos biológicos desplegados tempranamente en la regeneración de este tejido. Además, con la ayuda de herramientas bioinformáticas y apoyándonos en la literatura hemos podido identificar diversos blancos, los cuales serían interesantes de analizar en futuras investigaciones, para comprobar su importancia en el inicio de la regeneración de la médula y en la activación de los progenitores neurales de esta frente a una señal de daño.

Finalmente, a nivel funcional hemos comprobado la necesidad de una activación temprana de la vía de señalización mTOR en la regeneración de la médula espinal, sin embargo, son necesarios futuros esfuerzos para vislumbrar cual sería el mecanismo molecular, los tiempos de activación y las poblaciones celulares en las cuales ejerce su acción. Además es importante mencionar que la originalidad de nuestro trabajo no está en identificar a mTOR como una vía de señalización necesaria para la regeneración de la médula espinal, sino en el modelo

mecanístico que pudimos construir con nuestros datos en torno a esta vía de señalización. De esta manera, las pruebas funcionales realizadas en esta tesis son solo la puerta de entrada para probar nuestro modelo en futuras investigaciones.

6 Conclusiones

- Se implementó un método de muestreo sincronizado que nos permitió el óptimo uso de perfiles de alta resolución temporal para evaluar los cambios transcripcionales de la médula espinal de animales estadio-R en *Xenopus*.
- Se evaluó los cambios transcripcionales de la médula espinal mediante perfiles de alta resolución temporal en tres diferentes condiciones, transectado, sham y sin daño, secuenciándose 108 puntos temporales entre estas. Todas estas secuenciaciones con excelentes parámetros de calidad.
- Se identificaron 1.850 genes diferencialmente expresados por un daño directo a la médula espinal, para lo cual fue imprescindible el uso de las dos condiciones control seleccionadas y uso del análisis de Procesos Gaussianos para evaluar las diferencias entre condiciones.
- El análisis modular identificó 11 diferentes módulos de co-expresión, los cuales fueron subdivididos en negativa y positivamente regulados respecto al tiempo, e incluso estos últimos pudieron ser sub-agrupados en tempranos, intermedios y tardíos respecto a su máxima expresión.
- El uso de diversas herramientas bioinformáticas ayudó a entender los diversos procesos biológicos que son desplegados en la ventana de tiempo estudiada, así como también inferir una gran variedad de blancos que pueden ser importantes en el inicio del proceso de regeneración de la médula espinal y aún más en la activación de los progenitores neurales del canal ependimario en respuesta a una señal de daño, generando de esta manera muchas opciones para futuras investigaciones.

- Las pruebas de funcionalidad biológicas de la vía mTOR comprobaron su importancia en las primeras horas de la regeneración de la médula espinal, sugiriendo que es importante determinar el mecanismo por el cual ejerce su acción en las etapas más tempranas de este proceso.
- Esta tesis confirma que es posible utilizar perfiles de alta resolución temporal para estudiar los cambios tempranos del transcriptoma luego de una lesión en la médula espinal en animales regenerativos de *Xenopus*, y aún confirma que es posible identificar una vía de señalización fundamental en este proceso, mas no es posible asegurar que corresponda a la principal vía de señalización en el proceso.

7 Referencias

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11(7), 36-42.
- Al Haj Baddar, N. W., Chithrala, A., & Voss, S. R. (2019). Amputation-induced reactive oxygen species signaling is required for axolotl tail regeneration. *Developmental Dynamics*, 248(2), 189-196.
- Alvarado, A. S., & Tsonis, P. A. (2006). Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*, 7(11), 873.
- Anderson, M. A., O'Shea, T. M., Burda, J. E., Ao, Y., Barlatey, S. L., Bernstein, A. M., ... & Wollenberg, A. L. (2018). Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature*, 561(7723), 396.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Asem, M., Buechler, S., Wates, R., Miller, D., & Stack, M. (2016). Wnt5a signaling in cancer. *Cancers*, 8(9), 79.
- Assinck, P., Duncan, G. J., Hilton, B. J., Plemel, J. R., & Tetzlaff, W. (2017). Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nature neuroscience*, 20(5), 637.
- Avraham, R., & Yarden, Y. (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(2), 104.
- Bahrami, S., & Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in biological regulation*, 62, 37-49.

- Baser, A., Skabkin, M., & Martin-Villalba, A. (2017). Neural stem cell activation and the role of protein synthesis. *Brain Plasticity*, 3(1), 27-41.
- Baser, A., Skabkin, M., Kleber, S., Dang, Y., Balta, G. S. G., Kalamakis, G., ... & Bobadilla, E. L. (2019). Onset of differentiation is post-transcriptionally controlled in adult neural stem cells. *Nature*, 566(7742), 100.
- Bigarella, C. L., Liang, R., & Ghaffari, S. (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*, 141(22), 4206-4218.
- Blesch, A., Lu, P., Tsukada, S., Alto, L. T., Roet, K., Coppola, G., ... & Tuszynski, M. H. (2012). Conditioning lesions before or after spinal cord injury recruit broad genetic mechanisms that sustain axonal regeneration: superiority to camp-mediated effects. *Experimental neurology*, 235(1), 162-173.
- Bowes, J. B., Snyder, K. A., Segerdell, E., Gibb, R., Jarabek, C., Noumen, E., ... & Vize, P. D. (2007). Xenbase: a *Xenopus* biology and genomics resource. *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D761-D767.
- Brombin, A., Joly, J. S., & Jamen, F. (2015). New tricks for an old dog: ribosome biogenesis contributes to stem cell homeostasis. *Current opinion in genetics & development*, 34, 61-70.
- Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2015). ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide. *Current protocols in molecular biology*, 109(1), 21-29.

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 421.
- Carmel, J. B., Galante, A., Soteropoulos, P., Tolia, P., Recce, M., Young, W., & Hart, R. P. (2001). Gene expression profiling of acute spinal cord injury reveals spreading inflammatory signals and neuron loss. *Physiological genomics*, 7(2), 201-213.
- Casari, A., Schiavone, M., Facchinello, N., Vettori, A., Meyer, D., Tiso, N., ... & Argenton, F. (2014). A Smad3 transgenic reporter reveals TGF-beta control of zebrafish spinal cord development. *Developmental biology*, 396(1), 81-93.
- Chandran, V., Coppola, G., Nawabi, H., Omura, T., Versano, R., Huebner, E. A., ... & Blesch, A. (2016). A systems-level analysis of the peripheral nerve intrinsic axonal growth program. *Neuron*, 89(5), 956-970.
- Chauvin, C., Koka, V., Nouschi, A., Mieulet, V., Hoareau-Aveilla, C., Dreazen, A., ... & Pende, M. (2014). Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene*, 33(4), 474.
- Chen, C. H., Sung, C. S., Huang, S. Y., Feng, C. W., Hung, H. C., Yang, S. N., ... & Chen, W. F. (2016). The role of the PI3K/Akt/mTOR pathway in glial scar formation following spinal cord injury. *Experimental neurology*, 278, 27-41.
- Chen, C. H., & Poss, K. D. (2017). Regeneration genetics. *Annual review of genetics*, 51, 63-82.

- Chen, X., He, Y., & Lu, F. (2018). Autophagy in stem cell biology: a perspective on stem cell self-renewal and differentiation. *Stem cells international*, 2018.
- Chen, J., & Long, F. (2018). mTOR signaling in skeletal development and disease. *Bone research*, 6(1), 1.
- Chera, S., Ghila, L., Wenger, Y., & Galliot, B. (2011). Injury-induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis-induced compensatory proliferation in hydra head regeneration. *Development, growth & differentiation*, 53(2), 186-201.
- Collart, C., Owens, N. D., Bhaw-Rosun, L., Cooper, B., De Domenico, E., Patrushev, I., ... & Gilchrist, M. J. (2014). High-resolution analysis of gene activity during the *Xenopus* mid-blastula transition. *Development*, 141(9), 1927-1939.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.
- Cordeiro, J. V., & Jacinto, A. (2013). The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(4), 249.
- Di Giovanni, S., Knobloch, S. M., Brandoli, C., Aden, S. A., Hoffman, E. P., & Faden, A. I. (2003). Gene profiling in spinal cord injury shows role of cell cycle in neuronal death. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 53(4), 454-468.

- DuBuc, T. Q., Traylor-Knowles, N., & Martindale, M. Q. (2014). Initiating a regenerative response; cellular and molecular features of wound healing in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *BMC biology*, 12(1), 24.
- Edwards-Faret, G., Muñoz, R., Méndez-Olivos, E. E., Lee-Liu, D., Tapia, V. S., & Larraín, J. (2017). Spinal cord regeneration in *Xenopus laevis*. *nature protocols*, 12(2), 372.
- Edwards-Faret, G., Cebrián-Silla, A., Méndez-Olivos, E. E., González-Pinto, K., García-Verdugo, J. M., & Larraín, J. (2018). Cellular composition and organization of the spinal cord central canal during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Neurology*, 526(10), 1712-1732.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., ... & Sonnhammer, E. L. (2013). Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research*, 42(D1), D222-D230.
- Forouzmand, E., Owens, N. D., Blitz, I. L., Paraiso, K. D., Khokha, M. K., Gilchrist, M. J., ... & Cho, K. W. (2017). Developmentally regulated long non-coding RNAs in *Xenopus tropicalis*. *Developmental biology*, 426(2), 401-408.
- Fowler, T., Sen, R., & Roy, A. L. (2011). Regulation of primary response genes. *Molecular cell*, 44(3), 348-360.
- Gaete, M., Muñoz, R., Sánchez, N., Tampe, R., Moreno, M., Contreras, E. G., ... & Larraín, J. (2012). Spinal cord regeneration in *Xenopus* tadpoles proceeds through activation of Sox2-positive cells. *Neural development*, 7(1), 13.

- Galis, F., Wagner, G. P., & Jockusch, E. L. (2003). Why is limb regeneration possible in amphibians but not in reptiles, birds, and mammals?. *Evolution & development*, 5(2), 208-220.
- Gandin, V., Masvidal, L., Cargnello, M., Gyenis, L., McLaughlan, S., Cai, Y., ... & Stambolic, V. (2016). mTORC1 and CK2 coordinate ternary and eIF4F complex assembly. *Nature communications*, 7, 11127.
- Gandin, V., Masvidal, L., Hulea, L., Gravel, S. P., Cargnello, M., McLaughlan, S., ... & Furic, L. (2016). nanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs. *Genome research*, 26(5), 636-648.
- Ge, Y., Zhou, F., Chen, H., Cui, C., Liu, D., Li, Q., ... & Wei, Y. (2010). Sox2 is translationally activated by eukaryotic initiation factor 4E in human glioma-initiating cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(4), 711-717.
- Gemberling, M., Bailey, T. J., Hyde, D. R., & Poss, K. D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics*, 29(11), 611-620.
- Gensel, J. C., & Zhang, B. (2015). Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain research*, 1619, 1-11.
- Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., ... & Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development*, 13(11), 1422-1437.

- Gingras, A. C., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 913-963.
- Glass, D. J., & Hall, N. (2008). A brief history of the hypothesis. *Cell*, 134(3), 378-381.
- Goggin, M. M., Nelsen, C. J., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., Morley, S. J., & Albrecht, J. H. (2004). Rapamycin-sensitive induction of eukaryotic initiation factor 4F in regenerating mouse liver. *Hepatology*, 40(3), 537-544.
- Hartman, N. W., Lin, T. V., Zhang, L., Paquelet, G. E., Feliciano, D. M., & Bordey, A. (2013). mTORC1 targets the translational repressor 4E-BP2, but not S6 kinase 1/2, to regulate neural stem cell self-renewal in vivo. *Cell reports*, 5(2), 433-444.
- Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N., & Yanai, I. (2012). CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell reports*, 2(3), 666-673.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., & Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*, 131(22), 5539-5550.
- Hayashi, M., Ueyama, T., Nemoto, K., Tamaki, T., & Senba, E. (2000). Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*, 17(3), 203-218.
- He, Z., & Jin, Y. (2016). Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron*, 90(3), 437-451.
- Healy, S., Khan, P., & Davie, J. R. (2013). Immediate early response genes and cell transformation. *Pharmacology & therapeutics*, 137(1), 64-77.

- Hensman, J., Fusi, N., Andrade, R., Durrande, N., Saul, A., Zwiessle, M., & Lawrence, N. D. (2012). GPy: A gaussian process framework in python.
- Hur, E. M., & Zhou, F. Q. (2012). Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration. *Trends in neurosciences*, 35(3), 164-174.
- Edwards-Faret, G., Muñoz, R., Méndez-Olivos, E. E., Lee-Liu, D., Tapia, V. S., & Larraín, J. (2017). Spinal cord regeneration in *Xenopus laevis*. *Nature Protocols*, 12(2), 372.
- Jähner, D., & Hunter, T. O. N. Y. (1991). The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 11(7), 3682-3690.
- Johnson, W. E., Li, C., & Rabinovic, A. (2007). Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*, 8(1), 118-127.3
- Johnson, L. S., Eddy, S. R., & Portugaly, E. (2010). Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC bioinformatics*, 11(1), 431.
- Jolma, A., Yan, J., Whittington, T., Toivonen, J., Nitta, K. R., Rastas, P., ... & Palin, K. (2013). DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell*, 152(1-2), 327-339.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Kass, D. J. (2011). Cytokine-like factor 1 (CLF1): Life after development?. *Cytokine*, 55(3), 325-329.

- Kato, N., Matsumoto, M., Kogawa, M., Atkins, G. J., Findlay, D. M., Fujikawa, T., ... & Ogata, M. (2013). Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury in vivo. *Journal of neuroinflammation*, 10(1), 757.
- Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J. A., van der Lee, R., ... & Baranasic, D. (2017). JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic acids research*, 46(D1), D260-D266.
- Klopfenstein, D. V., Zhang, L., Pedersen, B. S., Ramírez, F., Vesztröcy, A. W., Naldi, A., ... & Dampier, W. (2018). GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology analyses. *Scientific reports*, 8(1), 10872.
- Ko, C. C., Tu, T. H., Wu, J. C., Huang, W. C., Tsai, Y. A., Huang, S. F., ... & Cheng, H. (2018). Functional improvement in chronic human spinal cord injury: Four years after acidic fibroblast growth factor. *Scientific reports*, 8(1), 12691.
- Kyritsis, N., Kizil, C., & Brand, M. (2014). Neuroinflammation and central nervous system regeneration in vertebrates. *Trends in Cell Biology*, 24(2), 128-135.
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics*, 9(1), 559.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), R25.

- Latella, G., Vetuschi, A., Sferra, R., Catitti, V., D'angelo, A., Zanninelli, G., ... & Gaudio, E. (2009). Targeted disruption of Smad3 confers resistance to the development of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in mice. *Liver International*, 29(7), 997-1009.
- Lavanderos, J., Muñoz, S., & Vilches, L. (2008). Traumatismo Raquimedular. *Cuad. Cir. (Valdivia)*, 22(1), 82-90.
- Lee-Liu, D., Edwards-Faret, G., Tapia, V. S., & Larraín, J. (2013). Spinal cord regeneration: lessons for mammals from non-mammalian vertebrates. *Genesis*, 51(8), 529-544.
- Lee-Liu, D., Moreno, M., Almonacid, L. I., Tapia, V. S., Muñoz, R., von Marées, J., ... & Larraín, J. (2014). Genome-wide expression profile of the response to spinal cord injury in *Xenopus laevis* reveals extensive differences between regenerative and non-regenerative stages. *Neural development*, 9(1), 12.
- Lee-Liu, D., Sun, L., Dovichi, N. J., & Larraín, J. (2018). Quantitative proteomics after spinal cord injury (SCI) in a regenerative and a nonregenerative stage in the frog *xenopus laevis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(4), 592-606.
- Leek, J. T., Johnson, W. E., Parker, H. S., Jaffe, A. E., & Storey, J. D. (2012). The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*, 28(6), 882-883.
- Leeman, D. S., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A. E., McKay, A., Pollina, E. A., ... & Mahmoudi, S. (2018). Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science*, 359(6381), 1277-1283.

- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12(1), 323.
- LiCausi, F., & Hartman, N. (2018). Role of mTOR complexes in neurogenesis. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1544.
- Lin, W. J., Gary, J. D., Yang, M. C., Clarke, S., & Herschman, H. R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15034-15044.
- Lin, C. J., Cencic, R., Mills, J. R., Robert, F., & Pelletier, J. (2008). c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation. *Cancer research*, 68(13), 5326-5334.
- Lin, H., Zhang, Q., Li, X., Wu, Y., Liu, Y., & Hu, Y. (2018). Identification of key candidate genes and pathways in hepatitis B virus-associated acute liver failure by bioinformatical analysis. *Medicine*, 97(5).
- Liu, K., Tedeschi, A., Park, K. K., & He, Z. (2011). Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. *Annual review of neuroscience*, 34, 131-152.
- Liu, L., Liu, X., Ren, X., Tian, Y., Chen, Z., Xu, X., ... & Fan, B. (2016). Smad2 and Smad3 have differential sensitivity in relaying TGF β signaling and inversely regulate early lineage specification. *Scientific reports*, 6, 21602.
- Liu, P., & Zhong, T. P. (2017). MAPK/ERK signalling is required for zebrafish cardiac regeneration. *Biotechnology letters*, 39(7), 1069-1077.

- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., & Martin-Villalba, A. (2015). Single-cell transcriptomics reveals a population of dormant neural stem cells that become activated upon brain injury. *Cell stem cell*, 17(3), 329-340.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550.
- Love, N. R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., ... & Amaya, E. (2013). Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature cell biology*, 15(2), 222.
- Lu, P., Wang, Y., Graham, L., McHale, K., Gao, M., Wu, D., ... & Zheng, B. (2012). Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell*, 150(6), 1264-1273.
- Maertens, A., Tran, V., Kleensang, A., & Hartung, T. (2018). Weighted Gene Correlation Network Analysis (WGCNA) Reveals Novel Transcription Factors Associated With Bisphenol A Dose-Response. *Frontiers in Genetics*, 9.
- Martínez Ortega, R. M., Tuya Pendás, L. C., Martínez Ortega, M., Pérez Abreu, A., & Cánovas, A. M. (2009). El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 8(2), 0-0.
- Maynard Jr, F. M., Bracken, M. B., Creasey, G., Ditunno Jr, J. F., Donovan, W. H., Ducker, T. B., ... & Waters, R. L. (1997). International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. *Spinal cord*, 35(5), 266.

- McCarroll, S. A., Murphy, C. T., Zou, S., Pletcher, S. D., Chin, C. S., Jan, Y. N., ... & Li, H. (2004). Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging. *Nature genetics*, 36(2), 197.
- McDonald, J. W., & Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *The Lancet*, 359(9304), 417-425.
- McLeay, R. C., & Bailey, T. L. (2010). Motif Enrichment Analysis: a unified framework and an evaluation on ChIP data. *BMC bioinformatics*, 11(1), 165.
- Méndez-Olivos, E. E., Muñoz, R., & Larraín, J. (2017). Spinal cord cells from pre-metamorphic stages differentiate into neurons and promote axon growth and regeneration after transplantation into the injured spinal cord of non-regenerative *Xenopus laevis* froglets. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 398.
- Méndez-Olivos, E. E., & Larraín, J. (2018). Cell Transplantation as a Method to Investigate Spinal Cord Regeneration in Regenerative and Nonregenerative *Xenopus* Stages. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(12), pdb-prot101006.
- Meng, D., Frank, A. R., & Jewell, J. L. (2018). mTOR signaling in stem and progenitor cells. *Development*, 145(1), dev152595.
- Merrick, W. C. (2015). eIF4F: a retrospective. *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), 24091-24099.
- Mina, M., Magi, S., Jurman, G., Itoh, M., Kawaji, H., Lassmann, T., ... & Daub, C. O. (2015). Promoter-level expression clustering identifies time development of transcriptional

regulatory cascades initiated by ErbB receptors in breast cancer cells. *Scientific reports*, 5, 11999.

- Minatohara, K., Akiyoshi, M., & Okuno, H. (2016). Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 78.

- Missinato, M. A., Saydmohammed, M., Zuppo, D. A., Rao, K. S., Opie, G. W., Kühn, B., & Tsang, M. (2018). *Dusp6* attenuates Ras/MAPK signaling to limit zebrafish heart regeneration. *Development*, 145(5), dev157206.

- Morgan, T. H. (1898). Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Development Genes and Evolution*, 7(2), 364-397.

- Muñoz, R., Edwards-Faret, G., Moreno, M., Zuñiga, N., Cline, H., & Larraín, J. (2015). Regeneration of *Xenopus laevis* spinal cord requires Sox2/3 expressing cells. *Developmental biology*, 408(2), 229-243.

- Neeb, A., Wallbaum, S., Novac, N., Dukovic-Schulze, S., Scholl, I., Schreiber, C., ... & Sleeman, J. P. (2012). The immediate early gene *Ier2* promotes tumor cell motility and metastasis, and predicts poor survival of colorectal cancer patients. *Oncogene*, 31(33), 3796.

- Newburger, D. E., & Bulyk, M. L. (2008). UniPROBE: an online database of protein binding microarray data on protein–DNA interactions. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D77-D82.

- Nieto-González, J. L., Gómez-Sánchez, L., Mavillard, F., Linares-Clemente, P., Rivero, M. C., Valenzuela-Villatoro, M., ... & Fernández-Chacón, R. (2019). Loss of postnatal

quiescence of neural stem cells through mTOR activation upon genetic removal of cysteine string protein- α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(16), 8000-8009.

- Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. (1994). *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)* Garland Publishing. New York, 252.

- O'Donnell, A., Odrowaz, Z., & Sharrocks, A. D. (2012). Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know?.

- Ohata, S., Uga, H., Okamoto, H., & Katada, T. (2018). Small GTPase R-Ras participates in neural tube formation in zebrafish embryonic spinal cord. *Biochemical and biophysical research communications*, 501(3), 786-790.

- O'Malley, M. A., Elliott, K. C., Haufe, C., & Burian, R. M. (2009). Philosophies of funding. *Cell*, 138(4), 611-615.

- Owens, N. D., Blitz, I. L., Lane, M. A., Patrushev, I., Overton, J. D., Gilchrist, M. J., ... & Khokha, M. K. (2016). Measuring absolute RNA copy numbers at high temporal resolution reveals transcriptome kinetics in development. *Cell reports*, 14(3), 632-647.

- Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P. D., Wang, C., Cai, B., ... & He, Z. (2008). Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science*, 322(5903), 963-966.

- Pruitt, K. D., Tatusova, T., & Maglott, D. R. (2006). NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_1), D61-D65.

- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2), W116-W120.
- Quinlan, A. R. (2014). BEDTools: the Swiss-army tool for genome feature analysis. *Current protocols in bioinformatics*, 47(1), 11-12.
- Quiroz, J. F. D., & Echeverri, K. (2013). Spinal cord regeneration: where fish, frogs and salamanders lead the way, can we follow? *Biochemical Journal*, 451(3), 353-364.
- Raftery, A. E. (1995). Bayesian model selection in social research. *Sociological methodology*, 25, 111-164.
- Ramer, L. M., Ramer, M. S., & Bradbury, E. J. (2014). Restoring function after spinal cord injury: towards clinical translation of experimental strategies. *The Lancet Neurology*, 13(12), 1241-1256.
- Rice, T., Larsen, J., Rivest, S., & Yong, V. W. (2007). Characterization of the early neuroinflammation after spinal cord injury in mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 66(3), 184-195.
- Ruppert, K. A., Olson, S. D., & Cox, C. S. (2019). Spinal Cord Injury. In *A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-based Therapeutics* (pp. 321-343). Academic Press.
- Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Watanabe, E., Seino, S., Narita, Y., ... & Kitanaka, C. (2014). Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem cell research*, 12(1), 119-131.

- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470.
- Self, A. J., Caron, E., Paterson, H. F., & Hall, A. (2001). Analysis of R-Ras signalling pathways. *Journal of Cell Science*, 114(7), 1357-1366.
- Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., ... & van Heeringen, S. J. (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538(7625), 336.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Sims, R. T. (1962). Transection of the spinal cord in developing *Xenopus laevis*. *Development*, 10(2), 115-126.
- Singer, G. A., Lloyd, A. T., Huminiecki, L. B., & Wolfe, K. H. (2004). Clusters of co-expressed genes in mammalian genomes are conserved by natural selection. *Molecular biology and evolution*, 22(3), 767-775.
- Song, G., Cechvala, C., Resnick, D. K., Dempsey, R. J., & Rao, V. L. R. (2001). Genechip® analysis after acute spinal cord injury in rat. *Journal of neurochemistry*, 79(4), 804-815.

- Stark, C., Breitkreutz, B. J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., & Tyers, M. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic acids research*, 34(suppl_1), D535-D539.
- Stewart, R., Rascon, C. A., Tian, S., Nie, J., Barry, C., Chu, L. F., ... & Leng, N. (2013). Comparative RNA-seq analysis in the unsequenced axolotl: the oncogene burst highlights early gene expression in the blastema. *PLoS computational biology*, 9(3), e1002936.
- Stramer, B. M., Austin, J. S., Roberts, A. B., & Fini, M. E. (2003). Absence of Myofibroblast Transformation in Corneas of Mice Deficient for the TGF-beta Signaling Mediator Smad3. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(13), 2145-2145.
- Subramaniam, M., Hawse, J. R., Rajamannan, N. M., Ingle, J. N., & Spelsberg, T. C. (2010). Functional role of KLF10 in multiple disease processes. *Biofactors*, 36(1), 8-18.
- Sueda, R., Imayoshi, I., Harima, Y., & Kageyama, R. (2019). High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent vs. active neural stem cells in the adult mouse brain. *Genes & development*.
- Sun, F., Park, K. K., Belin, S., Wang, D., Lu, T., Chen, G., ... & He, Z. (2011). Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature*, 480(7377), 372.
- Swift, M. L. (1997). GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. *Journal of chemical information and computer sciences*, 37(2), 411-412.
- Takahashi, S., Ebihara, A., Kajihara, H., Kontani, K., Nishina, H., & Katada, T. (2011). RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell death and differentiation*, 18(4), 645.

- Tao, Y., Wang, M., Chen, E., & Tang, H. (2017). Liver regeneration: analysis of the main relevant signaling molecules. *Mediators of inflammation*, 2017.
- Tapia, V. S., Herrera-Rojas, M., & Larrain, J. (2017). JAK-STAT pathway activation in response to spinal cord injury in regenerative and non-regenerative stages of *Xenopus laevis*. *Regeneration*, 4(1), 21-35.
- Thuret, S., Moon, L. D., & Gage, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(8), 628.
- Tsarouchas, T. M., Wehner, D., Cavone, L., Munir, T., Keatinge, M., Lambertus, M., ... & Feng, Y. (2018). Dynamic control of proinflammatory cytokines $Il-1\beta$ and $Tnf-\alpha$ by macrophages in zebrafish spinal cord regeneration. *Nature communications*, 9(1), 4670.
- Tu, M. K., & Borodinsky, L. N. (2014). Spontaneous calcium transients manifest in the regenerating muscle and are necessary for skeletal muscle replenishment. *Cell calcium*, 56(1), 34-41.
- Tullai, J. W., Schaffer, M. E., Mullenbrock, S., Sholder, G., Kasif, S., & Cooper, G. M. (2007). Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 23981-23995.
- Valouev, A., Johnson, D. S., Sundquist, A., Medina, C., Anton, E., Batzoglou, S., ... & Sidow, A. (2008). Genome-wide analysis of transcription factor binding sites based on ChIP-Seq data. *Nature methods*, 5(9), 829.

- van Dam, S., Vosa, U., van der Graaf, A., Franke, L., & de Magalhaes, J. P. (2017). Gene co-expression analysis for functional classification and gene–disease predictions. *Briefings in bioinformatics*, 19(4), 575-592.
- Walker, C. L., Walker, M. J., Liu, N. K., Risberg, E. C., Gao, X., Chen, J., & Xu, X. M. (2012). Systemic bisperoxovanadium activates Akt/mTOR, reduces autophagy, and enhances recovery following cervical spinal cord injury. *PLoS One*, 7(1), e30012.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57.
- Wang, L., Mitsui, T., Ishida, M., Izawa, M., & Arita, J. (2017). Rasd1 is an estrogen-responsive immediate early gene and modulates expression of late genes in rat anterior pituitary cells. *Endocrine journal*, 64(11), 1063-1071.
- Wang, X., Seekaew, P., Gao, X., & Chen, J. (2016). Traumatic brain injury stimulates neural stem cell proliferation via mammalian target of rapamycin signaling pathway activation. *eNeuro*, 3(5).
- Wenemoser, D., Lapan, S. W., Wilkinson, A. W., Bell, G. W., & Reddien, P. W. (2012). A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes & development*, 26(9), 988-1002.
- White, C. D., & Sacks, D. B. (2010). Regulation of MAP kinase signaling by calcium. In *MAP Kinase Signaling Protocols* (pp. 151-165). Humana Press, Totowa, NJ.
- Wu, D. M., Wang, Y. J., Han, X. R., Wen, X., Wang, S., Shen, M., ... & Li, M. Q. (2018). LncRNA LINC00880 promotes cell proliferation, migration, and invasion while inhibiting

apoptosis by targeting CACNG5 through the MAPK signaling pathway in spinal cord ependymoma. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 6689-6704.

- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J. J., & Fausto, N. (1997). Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1441-1446.

- Yang, G., Smibert, C. A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2014). An eIF4E1/4E-T complex determines the genesis of neurons from precursors by translationally repressing a proneurogenic transcription program. *Neuron*, 84(4), 723-739.

- Yoo, S. K., Freisinger, C. M., LeBert, D. C., & Huttenlocher, A. (2012). Early redox, Src family kinase, and calcium signaling integrate wound responses and tissue regeneration in zebrafish. *J Cell Biol*, 199(2), 225-234.

- Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., & He, Q. Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics: a journal of integrative biology*, 16(5), 284-287.

- Zhang, F., Dang, Y., Li, Y., Hao, Q., Li, R., & Qi, X. (2016). Cardiac Contractility modulation attenuate myocardial fibrosis by inhibiting TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in a rabbit model of chronic heart failure. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(1), 294-302.

8 Apéndices

Apéndice 1. Tabla I. Detalle de la calidad de la secuenciación y mapeo de las librerías.

RIN: Número de integridad de ARN; **ND:** Muestras de ARN en las cuales no fue posible determinar el grado de integridad; **% Q20:** porcentaje de lecturas con promedio de calidad ≥ 20 ; **% Q30:** porcentaje de lecturas con promedio de calidad ≥ 30 ; **% Nucl. N:** porcentaje de nucleótidos no identificados en la secuenciación; **Q-Base:** Calidad promedio de los nucleótidos secuenciados.

Serie	Muestra	260/280	260/230	RIN	ARN Total (ng)	# Lecturas	Longitud	% Q20	% Q30	% Nucl. N	Q-Base	% Lecturas mapeadas	
S1	-	0h (R1)	1.92	0.70	ND	360	19864452	50	99.1%	97.6%	0.1%	37.8	70.4%
	-	0h (R2)	1.86	0.61	ND	1230	17001050	50	99.3%	97.8%	0.1%	37.8	70.1%
	SHAM	0.5h	1.87	0.77	ND	396	16066080	50	99.1%	97.6%	0.1%	37.8	69.6%
	TRANS	0.5h	2.03	0.70	ND	400	18222957	50	98.9%	97.4%	0.1%	37.7	68.2%
	SHAM	1h	2.00	1.18	ND	552	18310893	50	99.0%	97.5%	0.1%	37.7	69.3%
	TRANS	1h	2.08	1.30	ND	400	17651652	50	99.0%	97.4%	0.1%	37.7	70.3%
	SHAM	1.5h	2.16	1.36	ND	340	14699064	50	98.9%	97.5%	0.0%	37.8	68.3%
	TRANS	1.5h	1.95	1.29	ND	428	16044732	50	99.6%	98.4%	0.0%	38.0	72.0%
	SHAM	2h	1.97	1.27	ND	443	16197643	50	99.3%	97.8%	0.0%	37.8	69.9%
	TRANS	2h	2.16	1.38	ND	455	16573749	50	99.2%	97.7%	0.0%	37.8	72.0%
S2	-	0h (R1)	2.06	2.13	ND	1994	19392167	50	99.0%	97.7%	0.0%	37.8	70.0%
	-	0h (R2)	2.06	2.02	ND	1790	18882037	50	99.2%	97.9%	0.0%	37.9	70.3%
	SHAM	0.5h	2.01	1.32	10.0	1869	15311616	50	99.0%	97.6%	0.0%	37.8	72.1%
	TRANS	0.5h	1.96	1.58	9.9	1268	16843042	50	99.1%	97.6%	0.0%	37.8	73.5%
	SHAM	1h	2.04	1.44	10.0	1759	19569871	50	99.0%	97.5%	0.0%	37.7	71.9%
	TRANS	1h	1.95	1.77	10.0	830	17802141	50	98.8%	97.3%	0.0%	37.7	70.6%
	SHAM	1.5h	1.90	1.29	ND	1271	20120753	50	99.0%	97.6%	0.0%	37.8	70.0%
	TRANS	1.5h	2.05	1.63	ND	1187	18352733	50	99.2%	97.8%	0.0%	37.8	72.7%
	SHAM	2h	2.06	1.98	10.0	1476	20769534	50	99.3%	97.8%	0.0%	37.8	73.3%
	TRANS	2h	1.90	0.77	ND	674	15071279	50	99.2%	97.6%	0.0%	37.7	71.4%

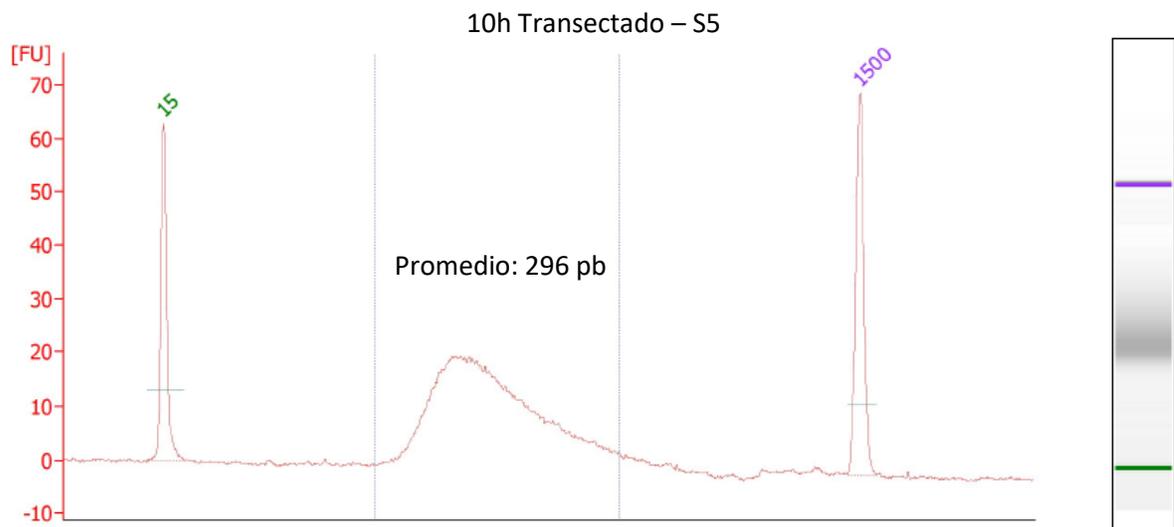
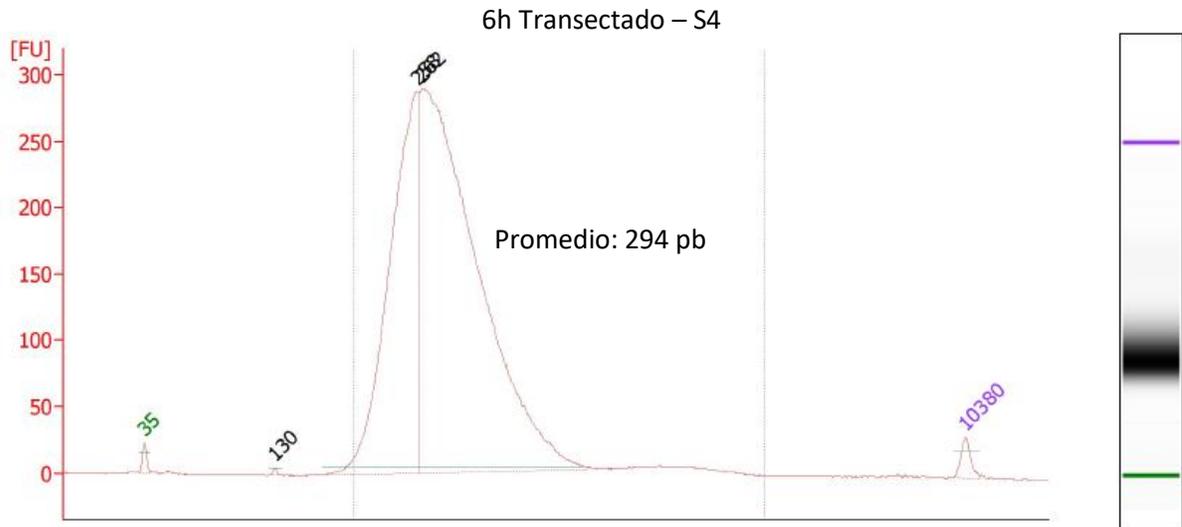
Serie	Muestra	260/280	260/230	RIN	ARN Total (ng)	# Lecturas	Longitud	% Q20	% Q30	% Bases N	Q-Base	% Lecturas mapeadas	
S3	-	0h	2.14	1.30	9.3	2074	19837973	51	99.2%	97.7%	0.0%	37.6	70.3%
	SHAM	1h	2.10	1.07	9.4	1251	27537214	51	99.1%	94.9%	0.0%	36.5	70.8%
	TRANS	1h	2.08	0.94	9.2	1571	16193233	51	99.1%	97.6%	0.0%	37.6	69.1%
	SHAM	2h	2.14	1.15	9.1	1374	18092933	51	99.2%	97.6%	0.0%	37.6	70.6%
	TRANS	2h	2.13	1.08	9.1	2109	21976557	51	99.7%	98.3%	0.0%	37.8	73.8%
	SHAM	3h	2.10	1.48	9.2	2415	14747972	51	99.5%	98.4%	0.0%	37.9	71.8%
	TRANS	3h	2.10	1.11	9.2	1898	36386417	51	99.0%	94.9%	0.0%	36.6	70.0%
	SHAM	4h	2.11	1.84	9.0	3457	30142561	51	99.4%	98.0%	0.0%	37.7	70.4%
	TRANS	4h	2.10	1.63	9.1	2630	23580012	51	99.5%	98.1%	0.0%	37.7	71.5%
	SHAM	5h	2.13	0.89	9.3	2137	51862469	51	99.1%	94.8%	0.0%	36.5	70.9%
	TRANS	5h	2.13	1.29	9.2	1747	42464794	51	99.5%	98.1%	0.0%	37.7	71.5%
	SHAM	6h	2.10	1.59	9.3	2888	26593936	51	99.5%	98.4%	0.0%	38.0	71.6%
TRANS	6h	2.09	1.83	9.2	3128	30639623	51	99.4%	98.0%	0.1%	37.7	72.1%	
S4	-	0h	2.12	1.11	9.2	3239	34293485	51	99.5%	98.0%	0.1%	37.7	71.2%
	SHAM	6h	2.17	0.42	9.3	1283	25559236	51	99.5%	98.4%	0.0%	38.0	68.6%
	TRANS	6h	2.10	1.40	9.2	2622	21267923	51	99.1%	97.9%	0.0%	37.8	71.3%
	SHAM	7h	2.12	1.89	9.1	3908	23190895	51	99.3%	97.7%	0.1%	37.7	72.4%
	TRANS	7h	2.11	1.62	9.1	3137	19264300	51	99.4%	98.0%	0.0%	37.8	71.3%
	SHAM	8h	2.12	1.48	9.1	3325	23717921	51	99.3%	98.0%	0.0%	37.8	71.5%
	TRANS	8h	2.08	1.88	9.2	3665	23346692	51	99.6%	98.5%	0.0%	38.0	72.5%
	SHAM	9h	2.10	2.01	9.1	3576	50305092	51	99.1%	94.7%	0.0%	36.5	71.8%
	TRANS	9h	2.11	1.33	9.4	3933	21458987	51	99.4%	97.6%	0.1%	37.6	71.6%
	SHAM	10h	2.09	1.61	9.4	2998	28627224	51	99.4%	97.8%	0.0%	37.7	71.3%
	TRANS	10h	2.11	1.66	9.1	1683	31972279	51	99.6%	98.2%	0.0%	37.8	71.1%
	SHAM	11h	2.08	1.86	-	4198	49683113	51	99.3%	95.1%	0.0%	36.6	72.5%
	TRANS	11h	2.09	1.42	9.2	3414	19180383	51	99.4%	98.0%	0.0%	37.8	72.8%
	SHAM	12h	2.12	1.80	9.2	3025	24306102	51	99.3%	97.9%	0.0%	37.8	70.8%
TRANS	12h	2.09	1.59	7.4	4427	17132651	51	99.6%	98.3%	0.0%	37.8	72.8%	

Serie	Muestra		260/280	260/230	RIN	ARN Total (ng)	# Lecturas	Longitud	% Q20	% Q30	% Bases N	Q-Base	% Lecturas mapeadas
S5	-	0h	2.08	1.79	9.9	1651	26334967	51	99.1%	97.1%	0.1%	37.4	69.5%
	SHAM	10h	2.06	0.20	9.4	486	26348795	51	98.8%	96.7%	0.1%	37.3	65.8%
	TRANS	10h	2.02	1.67	9.8	1028	25689539	51	99.1%	97.2%	0.1%	37.4	69.6%
	SHAM	11h	2.09	0.87	9.8	848	19493335	51	99.2%	97.4%	0.1%	37.5	67.0%
	TRANS	11h	2.08	1.84	9.7	1087	31742604	51	98.8%	96.7%	0.1%	37.3	68.0%
	SHAM	12h	2.10	0.36	9.7	909	25222408	51	98.6%	96.5%	0.1%	37.2	67.9%
	TRANS	12h	1.98	0.43	9.7	788	35741701	51	98.8%	96.5%	0.1%	37.3	70.4%
	SHAM	13h	2.05	0.36	10.0	1330	28932056	51	99.3%	97.0%	0.1%	37.4	71.1%
	TRANS	13h	1.97	0.85	10.0	718	32919536	51	99.2%	96.8%	0.1%	37.4	73.9%
	SHAM	14h	1.97	1.29	9.7	867	27499234	51	99.1%	96.6%	0.1%	37.3	71.8%
	TRANS	14h	2.03	0.99	10.0	969	30614502	51	99.3%	97.0%	0.1%	37.4	70.2%
	SHAM	15h	2.05	1.09	10.0	1252	38224480	51	99.2%	96.2%	0.1%	37.2	73.0%
	TRANS	15h	2.07	0.35	9.5	1025	37218330	51	99.0%	96.0%	0.1%	37.1	70.2%
	SHAM	16h	1.88	0.34	9.7	587	26539788	51	99.1%	96.0%	0.1%	37.1	70.8%
	TRANS	16h	2.01	1.33	9.6	1253	21079571	51	98.9%	96.8%	0.1%	37.4	70.4%
	SHAM	17h	1.90	1.03	9.7	552	30194620	51	99.0%	96.1%	0.1%	37.1	67.2%
	TRANS	17h	2.04	0.60	9.8	1079	39159329	51	98.6%	95.7%	0.1%	37.0	70.9%
	SHAM	18h	2.06	0.54	9.8	1027	27922262	51	98.8%	95.8%	0.1%	37.1	68.0%
TRANS	18h	2.06	1.26	9.9	1149	108006595	51	98.6%	95.2%	0.2%	36.7	71.6%	
S6	-	0h	2.10	-	9.0	3279	29889602	51	98.5%	96.8%	0.1%	37.3	69.6%
	SHAM	16h	2.09	-	9.6	2152	43043267	51	96.3%	88.9%	0.5%	35.0	64.3%
	TRANS	16h	2.11	-	9.5	3851	52225695	51	96.8%	89.0%	0.5%	35.1	64.7%
	SHAM	17h	2.07	-	9.4	3106	41853129	51	95.3%	87.7%	0.4%	34.7	61.4%
	TRANS	17h	2.09	-	9.3	2977	29163192	51	98.8%	97.0%	0.1%	37.4	65.2%
	SHAM	18h	2.06	-	9.3	3073	32193154	51	97.9%	95.9%	0.1%	37.1	66.7%
	TRANS	18h	2.11	-	9.3	2852	30364293	51	98.1%	96.2%	0.1%	37.2	68.5%
	SHAM	19h	2.07	-	9.1	1188	23766288	51	98.7%	96.9%	0.1%	37.4	67.8%
	TRANS	19h	2.10	-	9.4	2060	27048993	51	98.3%	96.3%	0.1%	37.3	67.9%

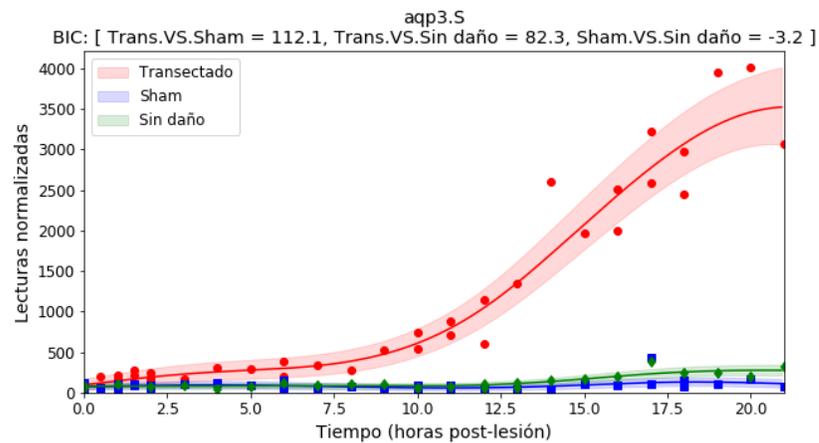
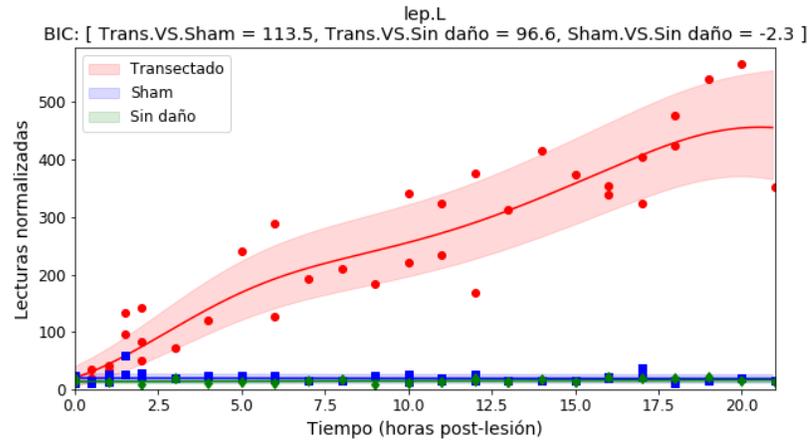
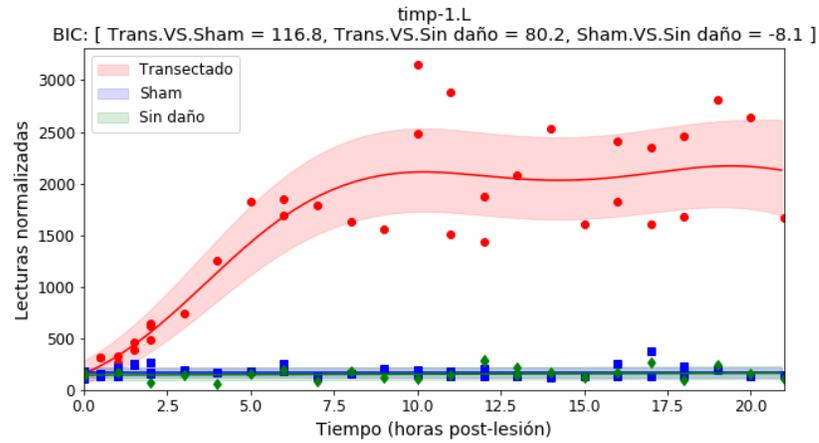
Serie	Muestra	260/280	260/230	RIN	ARN Total (ng)	# Lecturas	Longitud	% Q20	% Q30	% Bases N	Q-Base	% Lecturas mapeadas	
S6	SHAM	20h	2.12	-	9.3	3289	27592826	51	97.5%	95.5%	0.1%	37.1	63.2%
	TRANS	20h	2.08	-	9.2	3019	23443149	51	98.2%	96.2%	0.1%	37.3	67.9%
	SHAM	21h	2.06	-	9.1	2392	25636766	51	98.8%	96.9%	0.1%	37.4	66.5%
	TRANS	21h	2.11	-	9.7	4005	31009574	51	99.1%	97.3%	0.1%	37.5	67.3%
S7	UNINJ	0h	2.10	-	9.9	3192	32204037	51	96.8%	94.4%	0.1%	36.7	66.2%
	UNINJ	1h	2.07	-	9.9	1663	30573605	51	97.3%	94.9%	0.1%	36.9	64.6%
	UNINJ	2h	2.10	-	10.0	3920	30944504	51	98.8%	96.6%	0.1%	37.3	69.1%
	UNINJ	3h	2.06	-	10.0	2710	30922773	51	99.0%	96.9%	0.1%	37.4	69.6%
	UNINJ	4h	2.08	-	10.0	4699	34844190	51	98.1%	95.9%	0.1%	37.1	66.9%
	UNINJ	5h	2.08	-	9.8	2416	27674143	51	97.7%	95.4%	0.1%	37.0	67.2%
	UNINJ	6h	2.10	-	10.0	2308	27516635	51	96.6%	94.3%	0.1%	36.7	65.9%
	UNINJ	7h	2.11	-	10.0	4261	31055511	51	98.6%	96.5%	0.1%	37.3	65.2%
	UNINJ	8h	2.10	-	10.0	4015	21801494	51	97.9%	95.7%	0.1%	37.1	64.8%
	UNINJ	9h	2.11	-	10.0	3678	21228743	51	97.3%	95.1%	0.2%	36.7	64.6%
	UNINJ	10h	2.11	-	9.9	3507	28650110	51	98.5%	96.3%	0.2%	37.1	69.0%
	UNINJ	11h	2.07	-	10.0	3684	36070048	51	97.3%	95.1%	0.2%	36.8	64.3%
	UNINJ	12h	2.12	-	10.0	2858	23071050	51	96.3%	94.0%	0.2%	36.5	66.6%
UNINJ	13h	2.09	-	10.0	2824	28002613	51	98.0%	95.4%	0.1%	36.9	66.1%	
S8	UNINJ	0h	2.10	-	10.0	3896	26931801	51	97.4%	95.3%	0.1%	37.0	66.9%
	UNINJ	12h	2.11	-	9.7	4016	26482971	51	97.2%	95.0%	0.3%	36.7	69.5%
	UNINJ	13h	2.09	-	9.5	3536	33717355	51	98.5%	95.9%	0.1%	37.0	66.2%
	UNINJ	14h	2.12	-	9.4	3424	31598901	51	98.4%	96.0%	0.1%	37.0	68.1%
	UNINJ	15h	2.12	-	10.0	5268	28371384	51	98.3%	95.8%	0.1%	37.0	65.4%
	UNINJ	16h	2.09	-	9.4	4514	33321746	51	98.2%	95.8%	0.1%	37.0	68.4%
	UNINJ	17h	2.08	-	9.8	2929	28993749	51	98.8%	96.7%	0.2%	37.3	70.3%
	UNINJ	18h	2.10	-	10.0	5017	34612737	51	98.2%	96.0%	0.2%	37.0	64.6%
	UNINJ	19h	2.10	-	9.6	2955	32463905	51	97.6%	95.4%	0.2%	36.9	66.9%
UNINJ	20h	2.10	-	9.4	3162	28548009	51	98.7%	96.6%	0.2%	37.2	68.4%	

Serie	Muestra		260/280	260/230	RIN	ARN Total (ng)	# Lecturas	Longitud	% Q20	% Q30	% Bases N	Q-Base	% Lecturas mapeadas
S8	UNINJ	21h	2.12	-	10.0	4185	45561395	51	97.7%	95.7%	0.2%	37.0	65.6%
	UNINJ	22h	2.06		9.3	3332	49439903	51	96.4%	88.6%	0.5%	35.0	67.9%
	UNINJ	23h	2.12		9.3	3368	48109890	51	95.4%	87.8%	0.5%	34.7	64.3%
	UNINJ	24h	2.08		9.4	3001	28491576	51	97.5%	95.5%	0.1%	37.0	67.6%

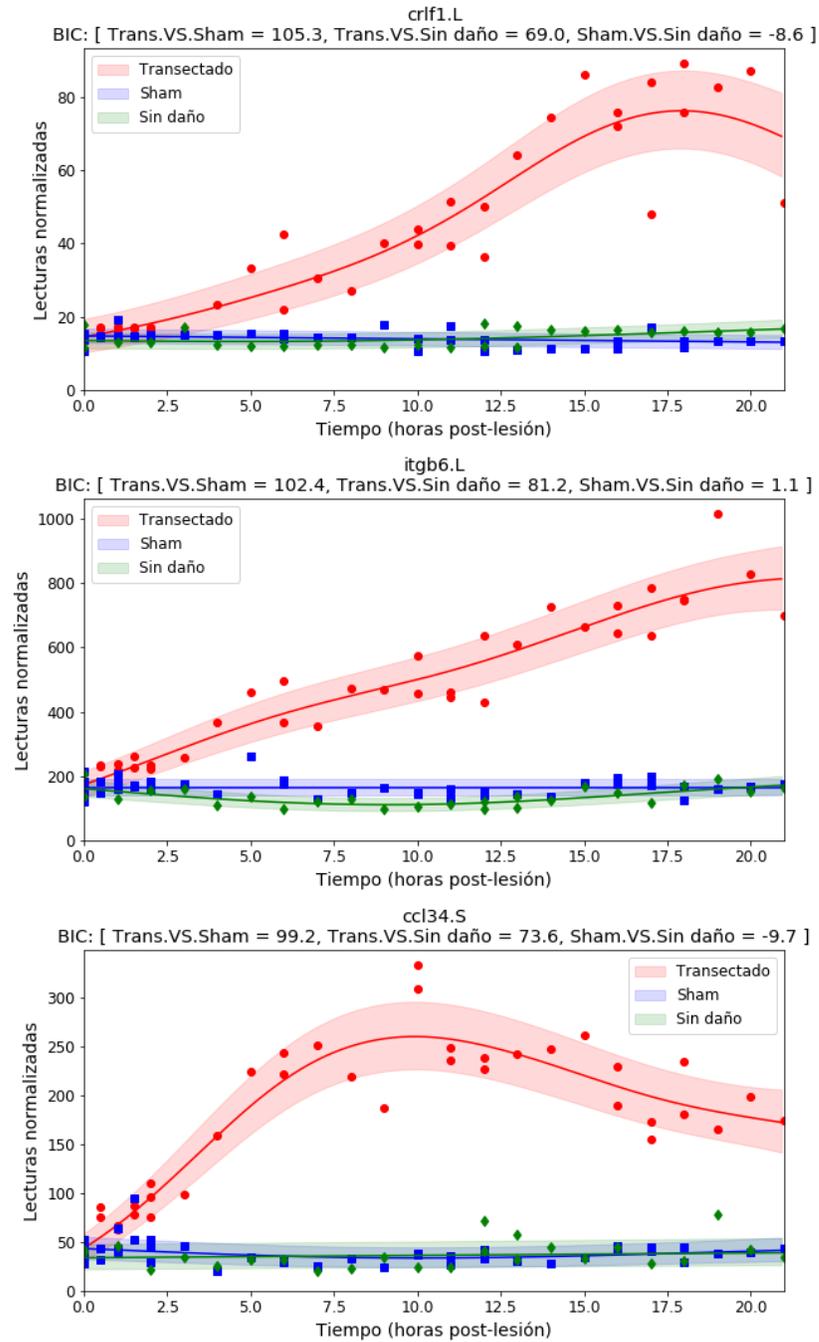
Apéndice 2. Ejemplos de electroferogramas de librerías Illumina para secuenciación de ARNm.



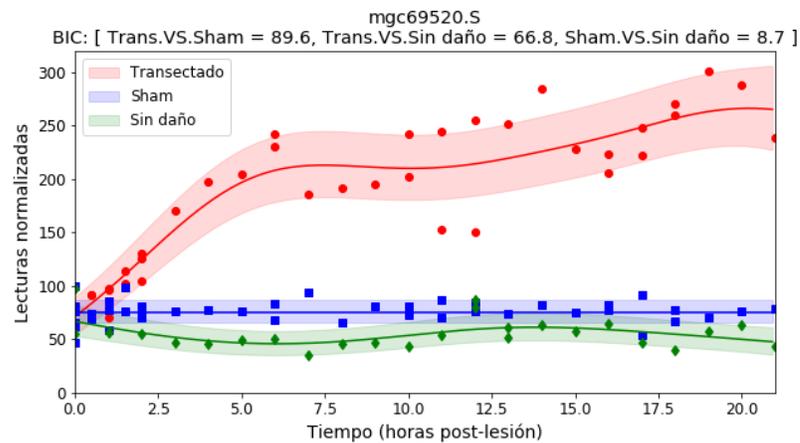
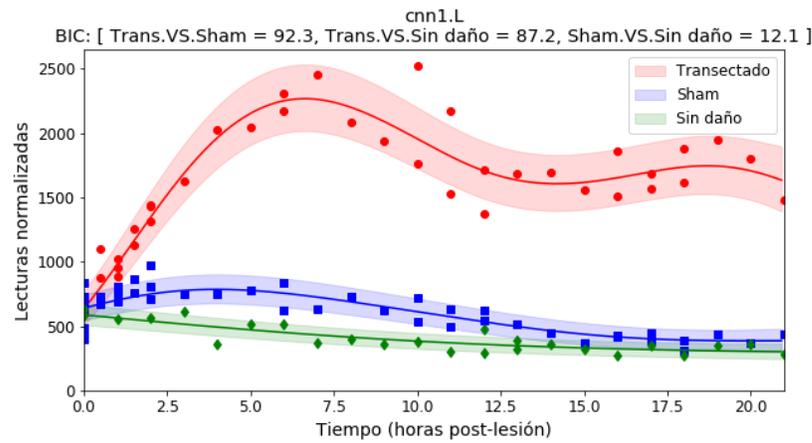
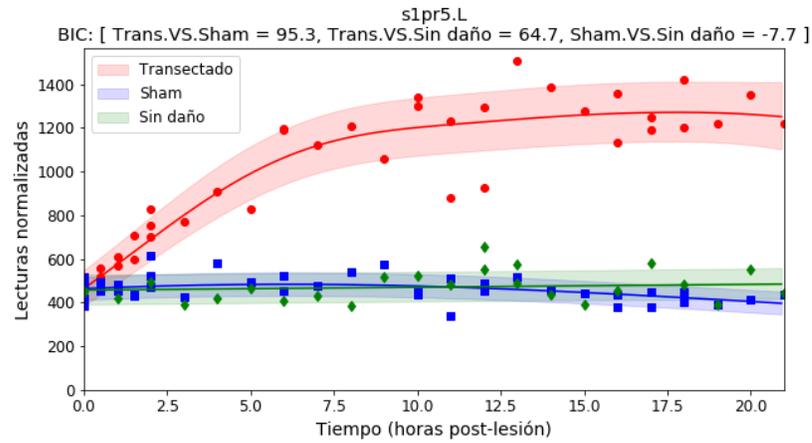
Apéndice 3. Perfiles de expresión de los 18 genes con mayores cambios en expresión diferencial.



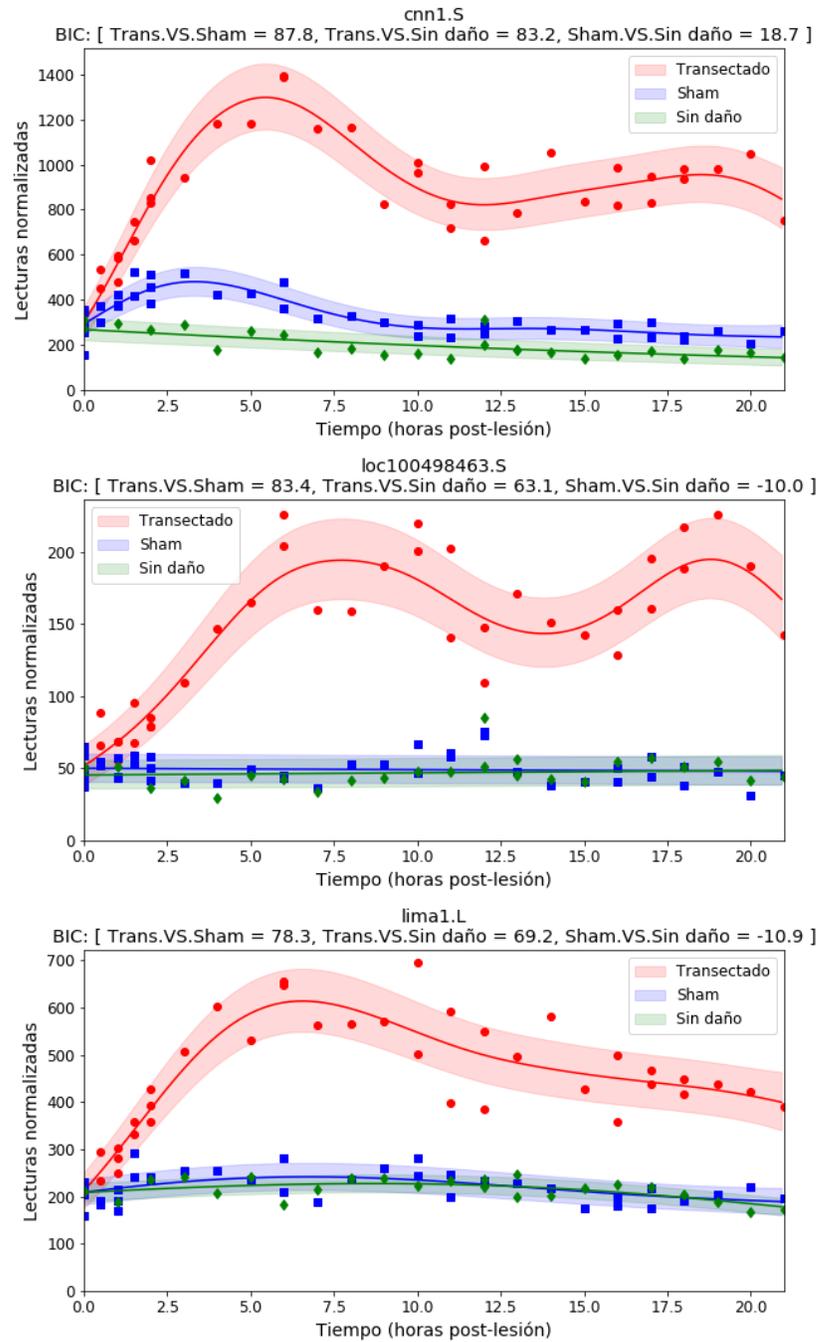
Continuación. Perfiles de expresión de los 18 genes con mayores cambios en expresión diferencial.



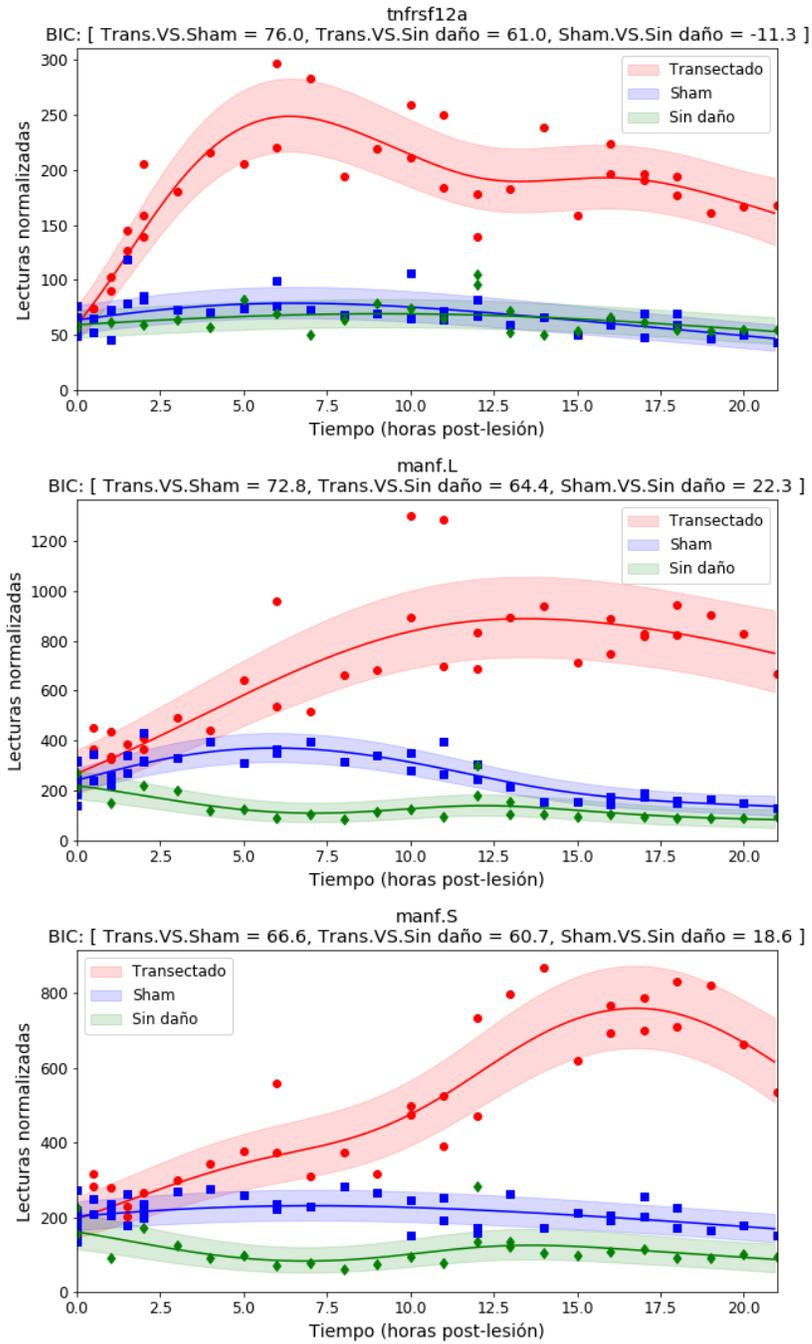
Continuación. Perfiles de expresión de los 18 genes con mayores cambios en expresión diferencial.



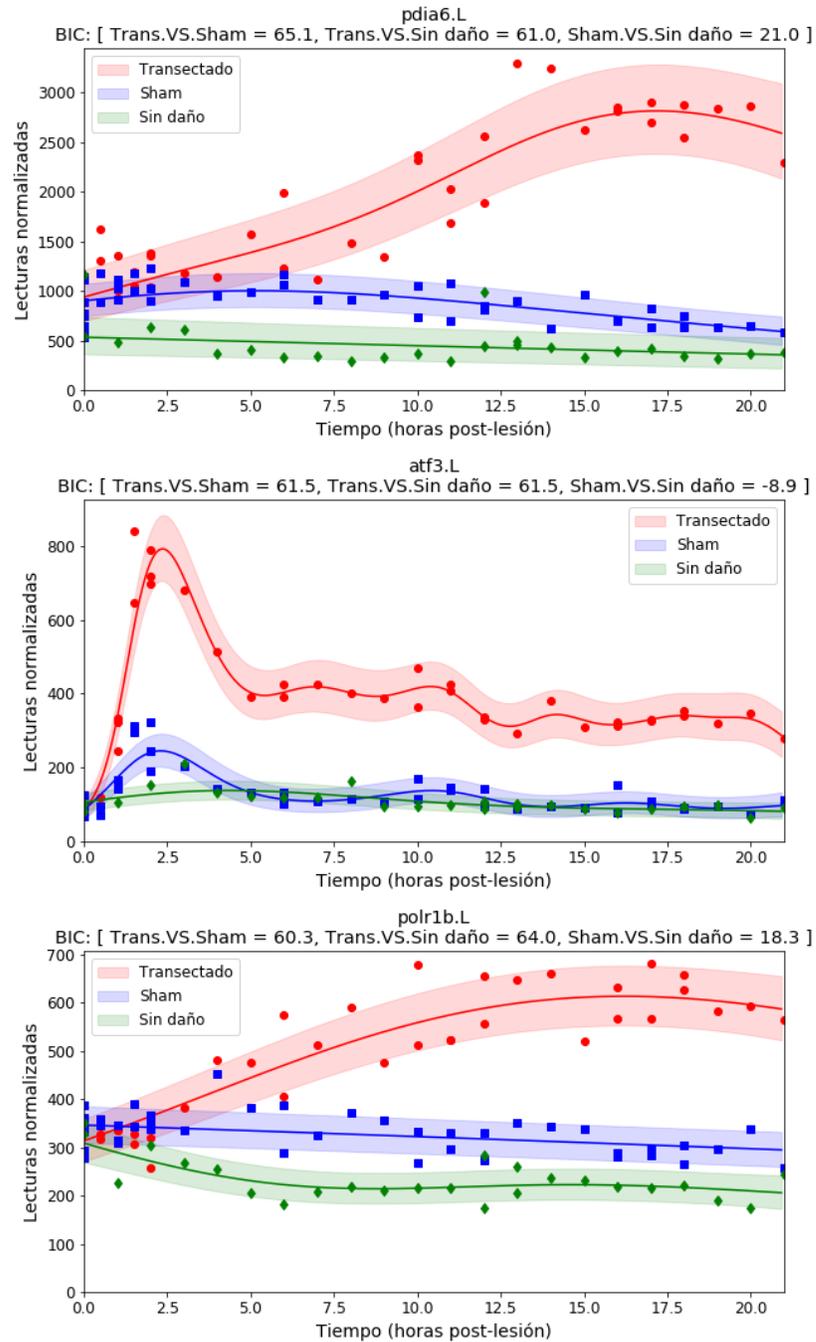
Continuación. Perfiles de expresión de los 18 genes con mayores cambios en expresión diferencial.



Continuación. Perfiles de expresión de los 18 genes con mayores cambios en expresión diferencial.



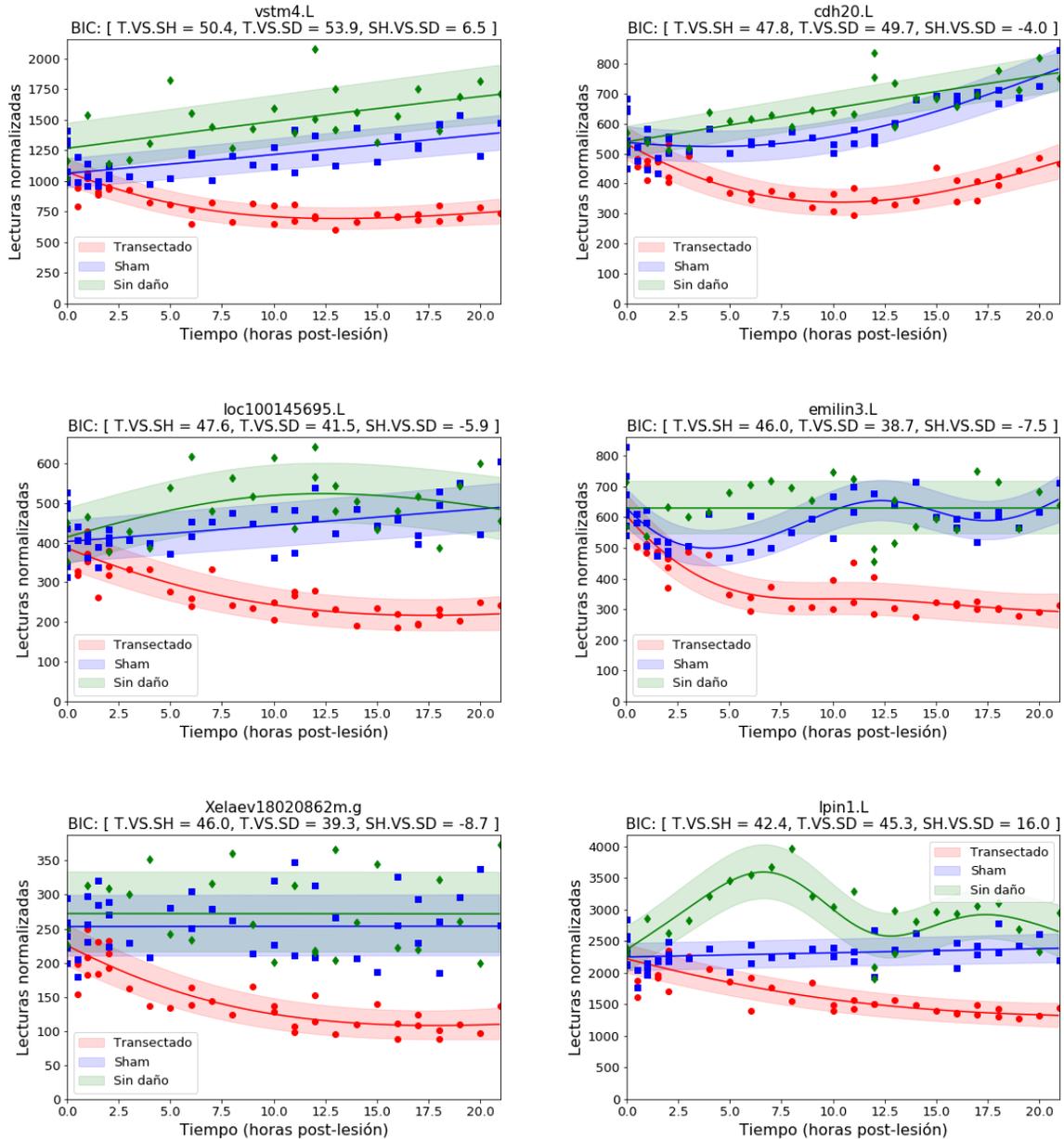
Continuación. Perfiles de expresión de los 18 genes con mayores cambios en expresión diferencial.



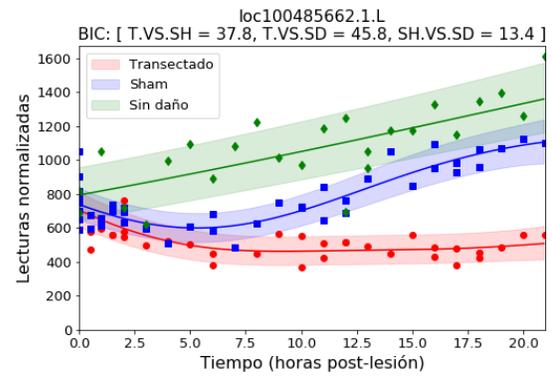
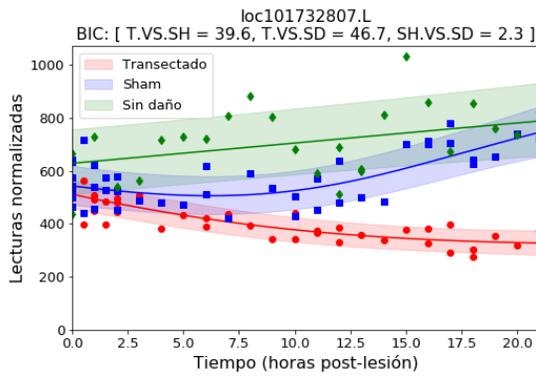
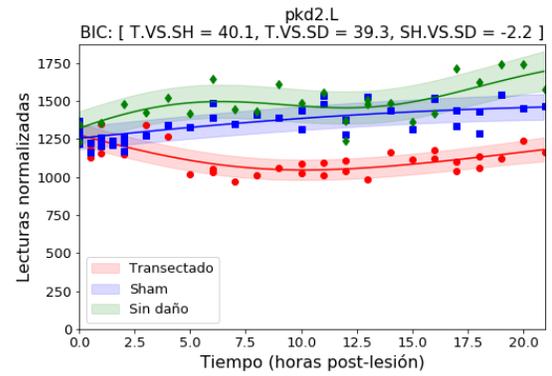
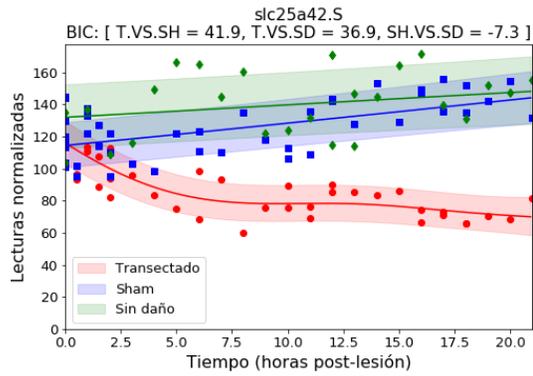
Apéndice 4. Perfiles de expresión de los 10 genes con mayores cambios en expresión diferencial para cada módulo de co-expresión.

T.VS.SH: comparación transectado contra sham; **T.VS.SD:** comparación transectado contra sin daño; **S.VS.SD:** comparación sham contra sin daño.

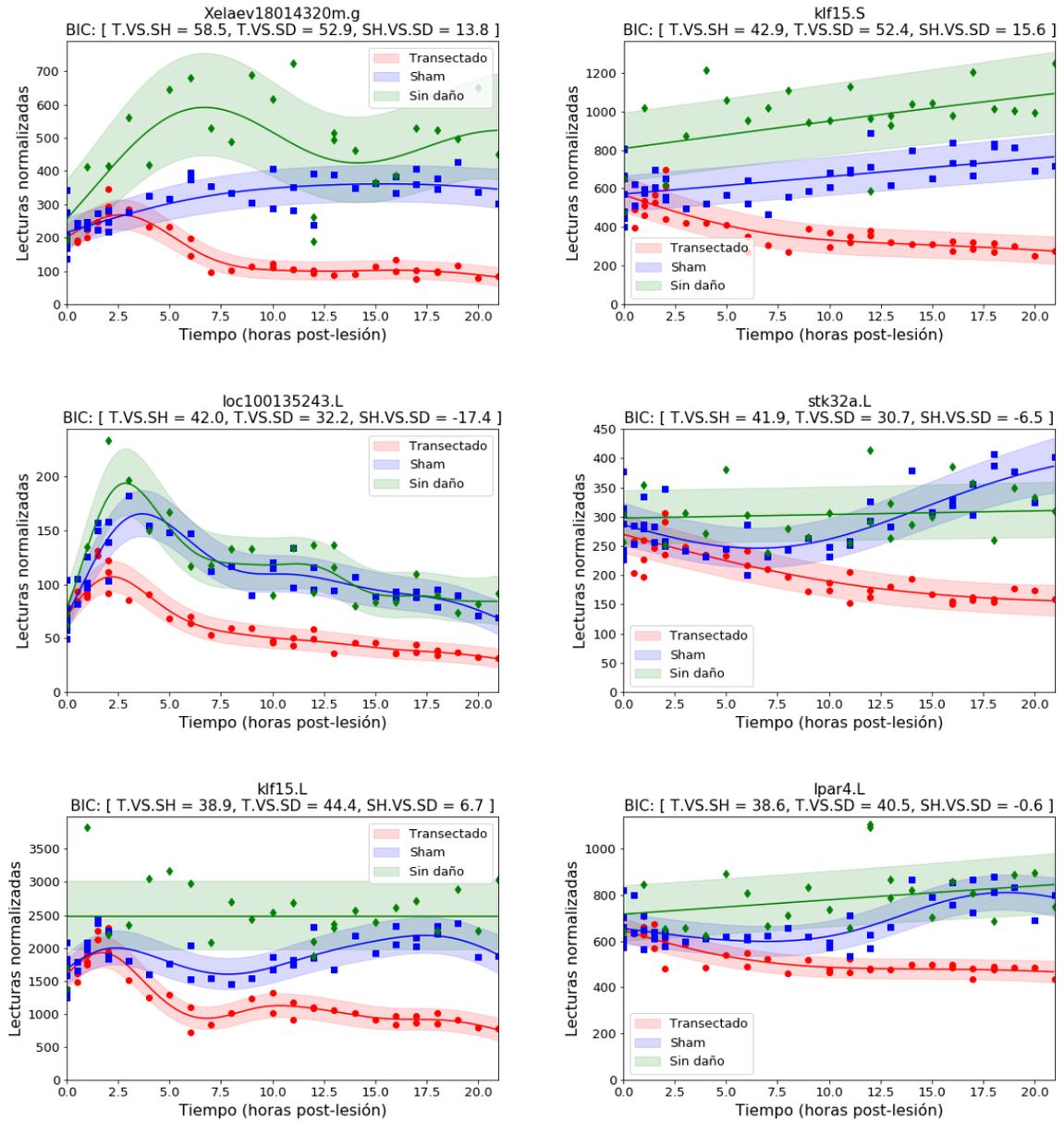
Módulo D1.



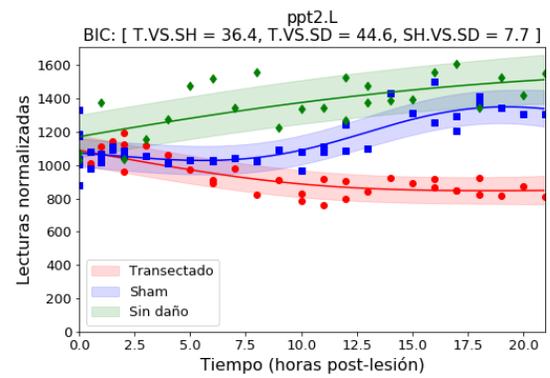
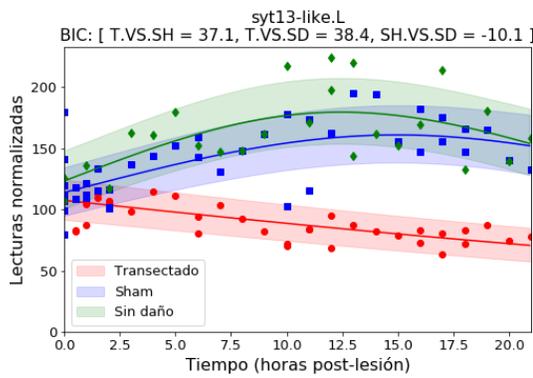
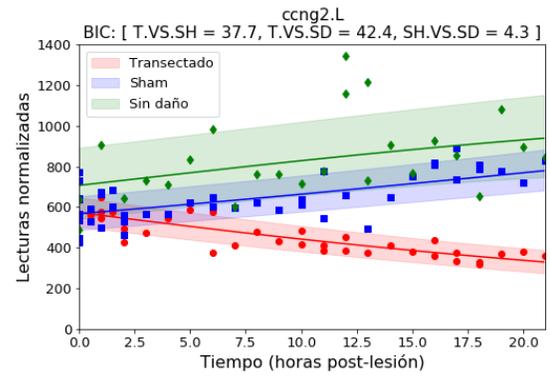
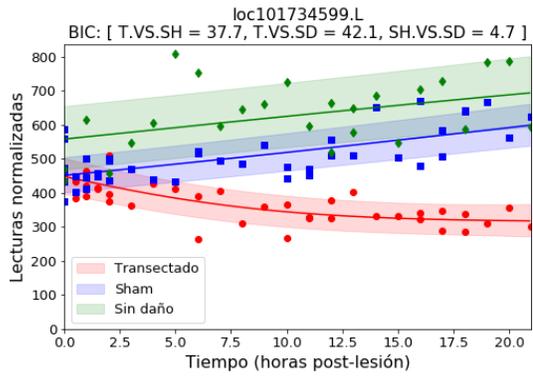
Continuación. Módulo D1.



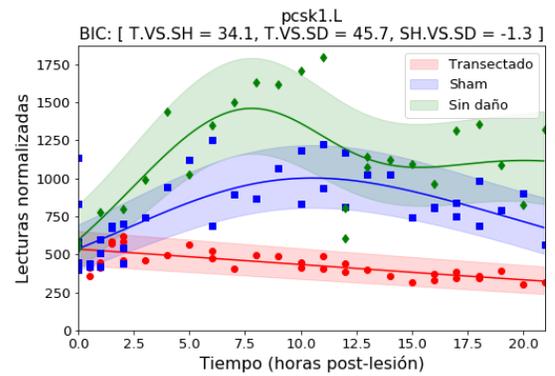
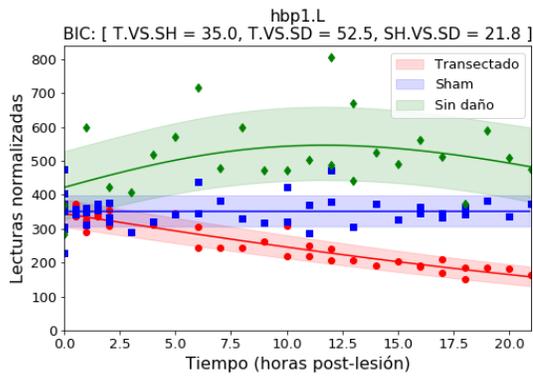
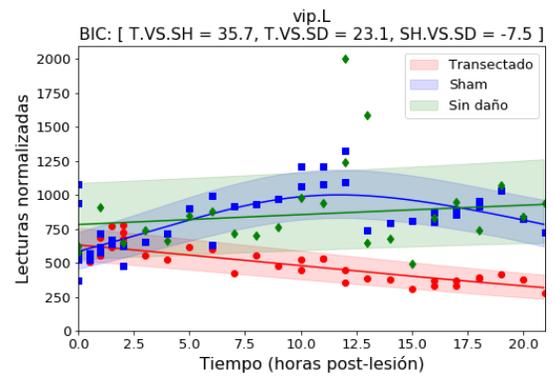
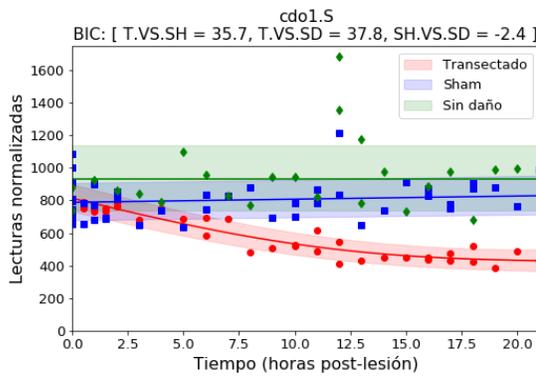
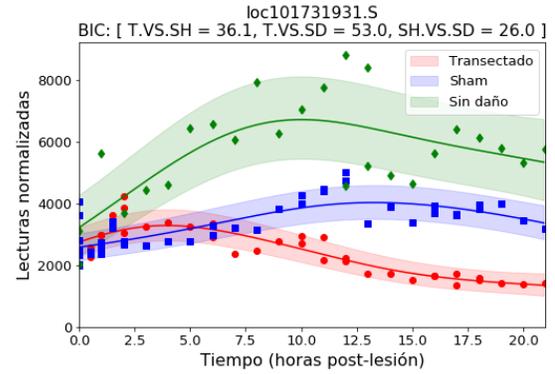
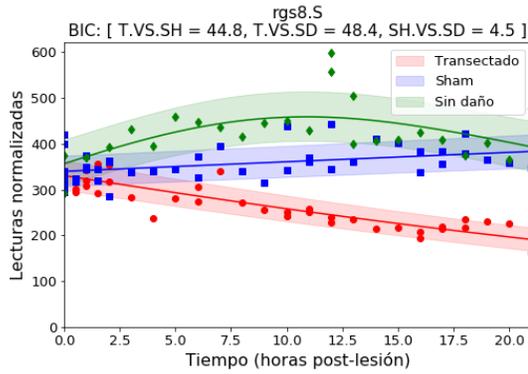
Módulo D2.



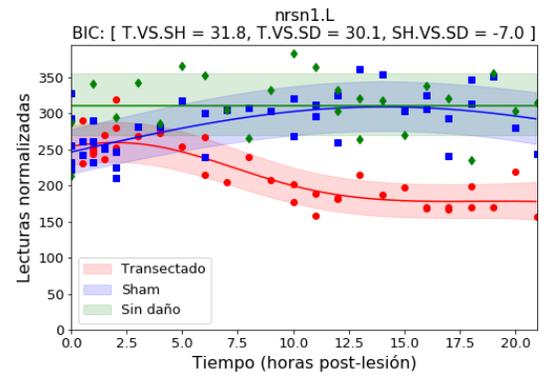
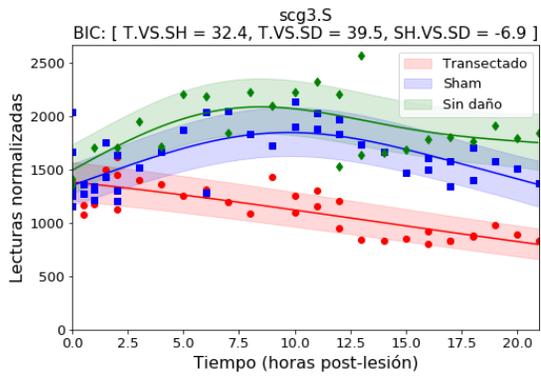
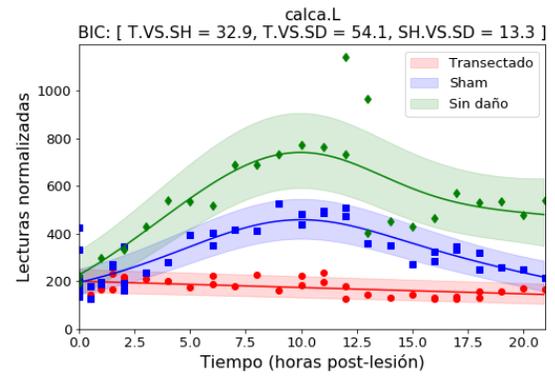
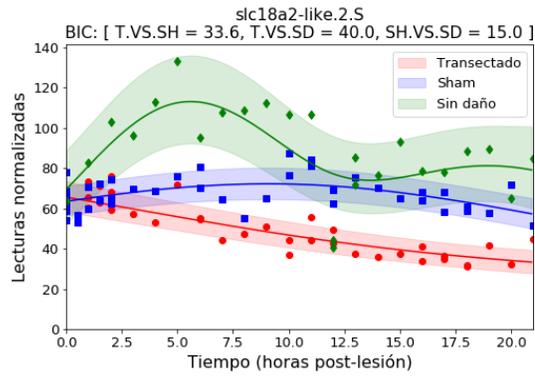
Continuación. Módulo D2.



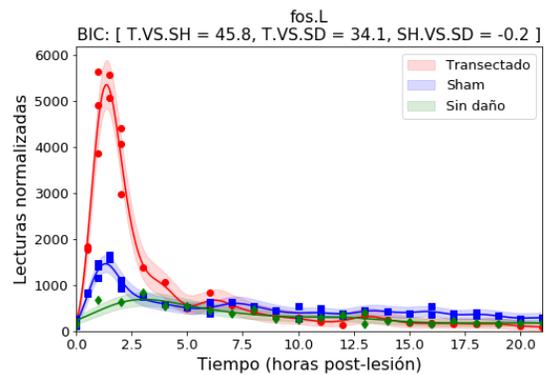
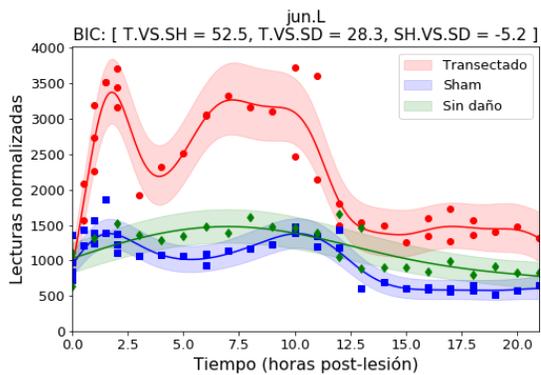
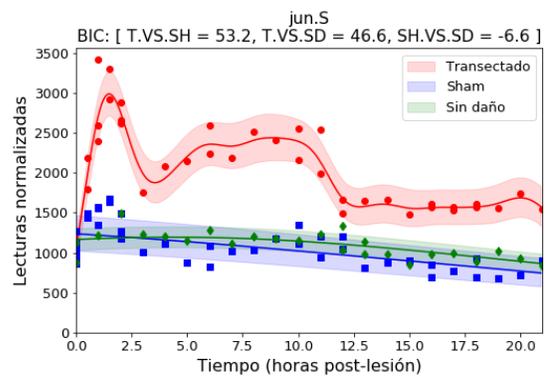
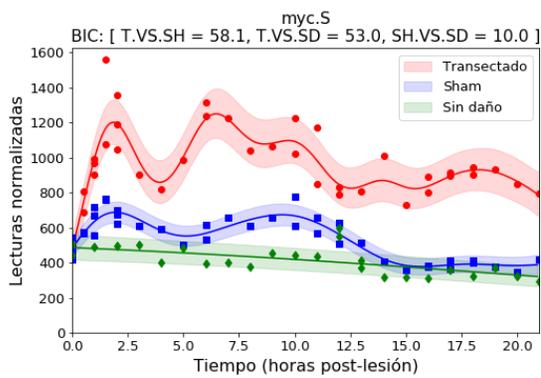
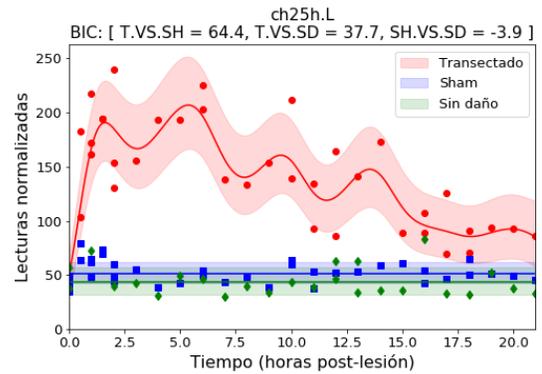
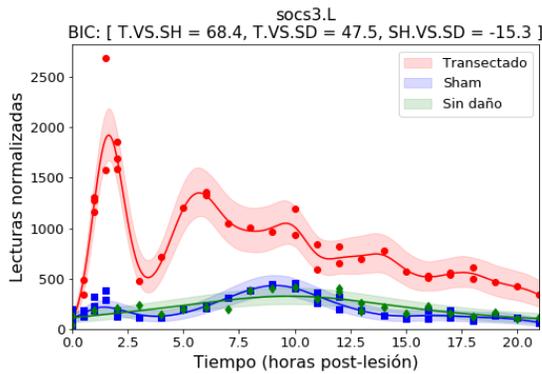
Módulo D3.



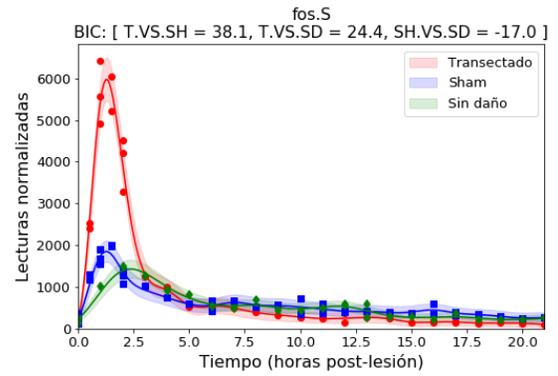
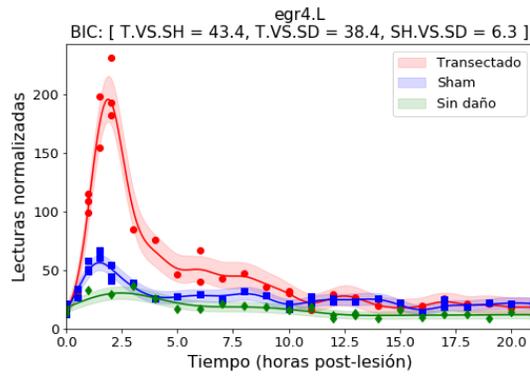
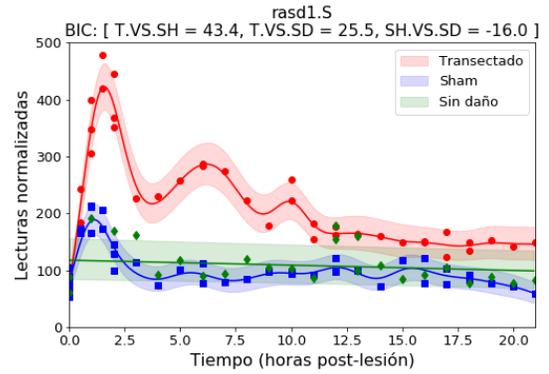
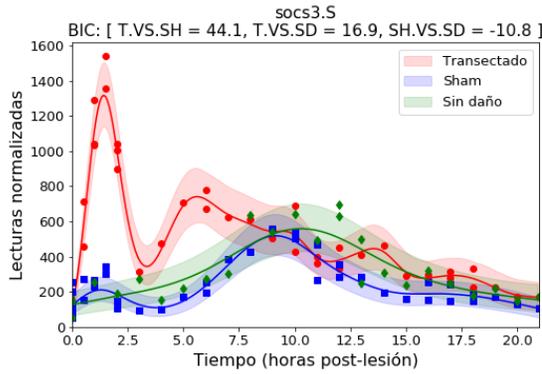
Continuación. Módulo D3.



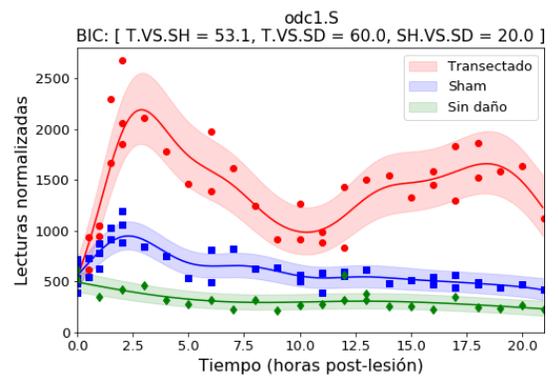
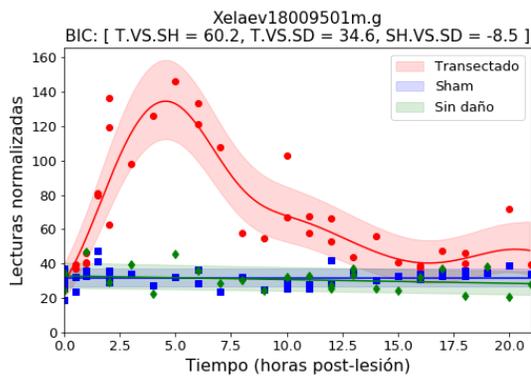
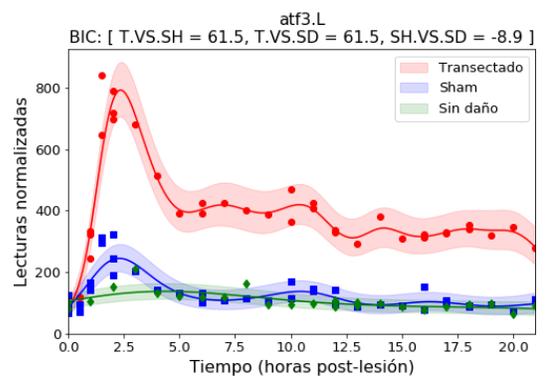
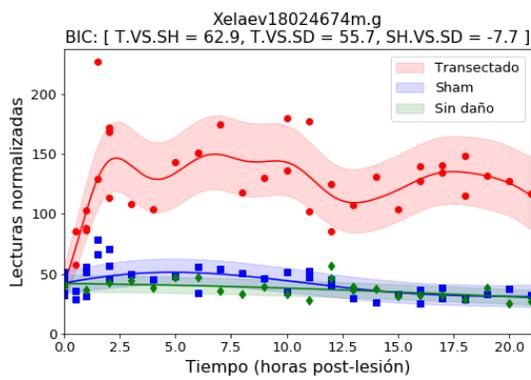
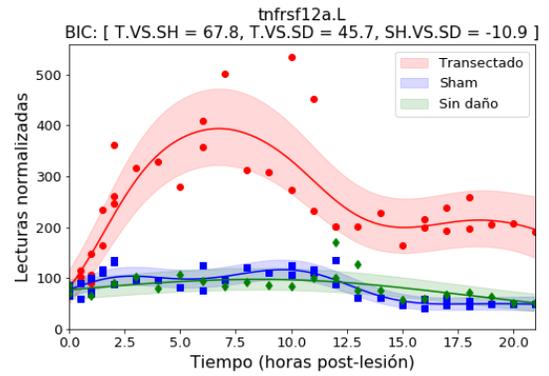
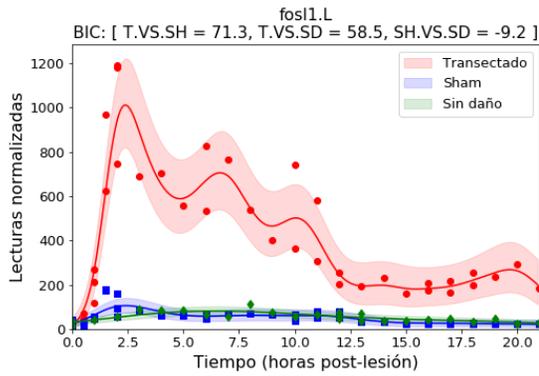
Módulo E1.



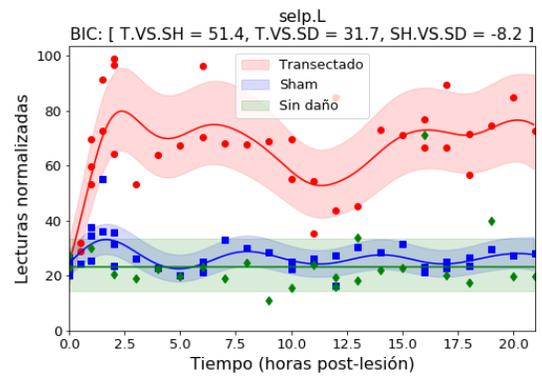
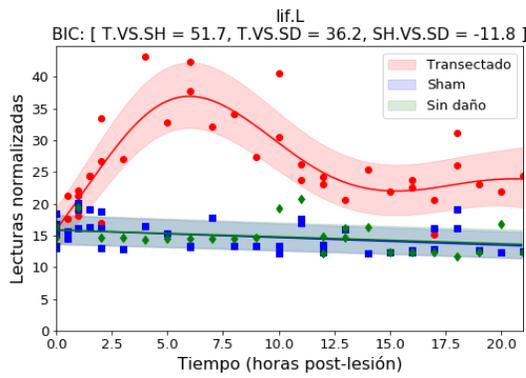
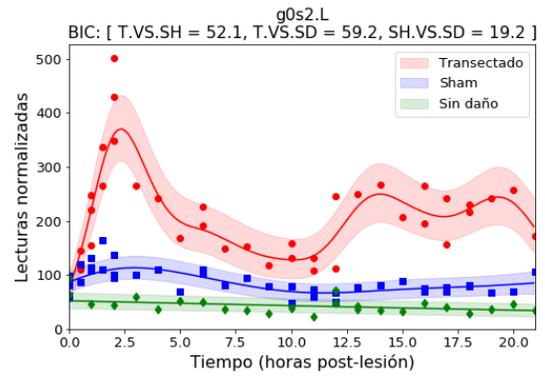
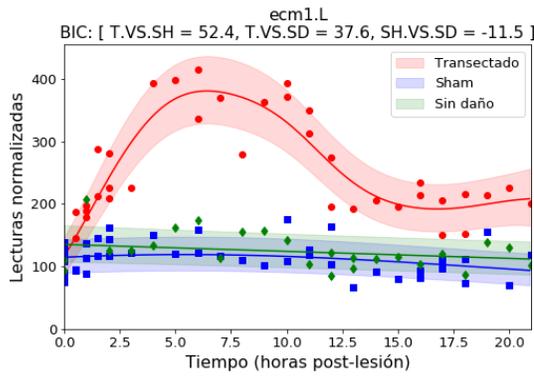
Continuación. Módulo E1.



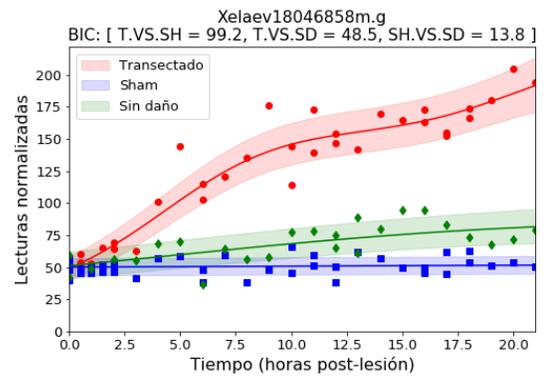
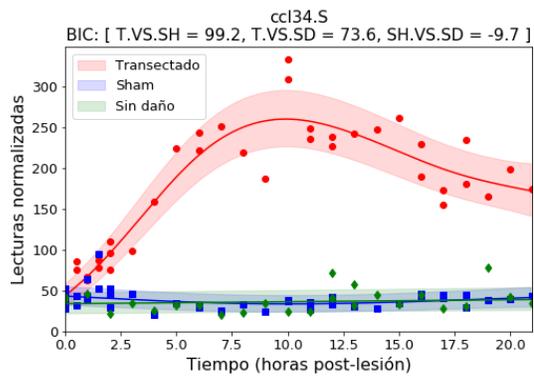
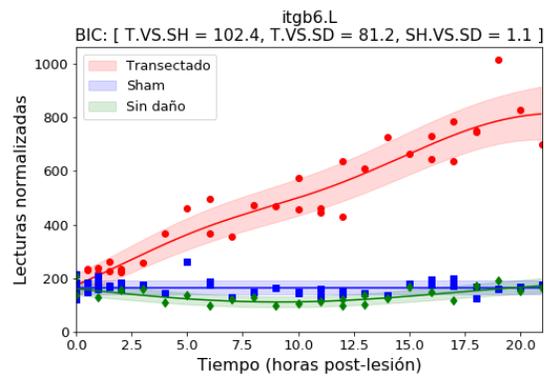
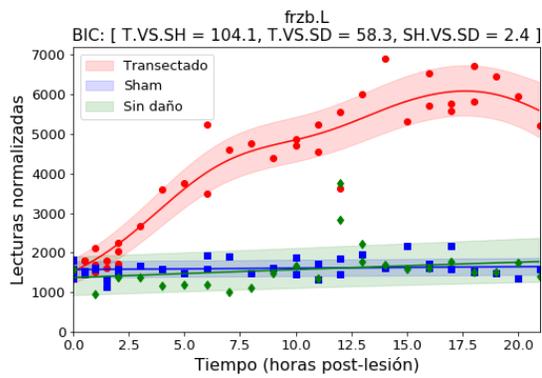
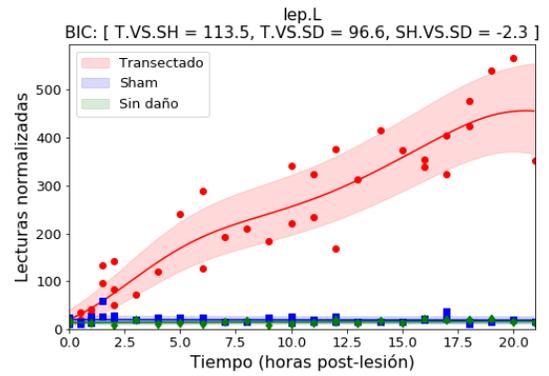
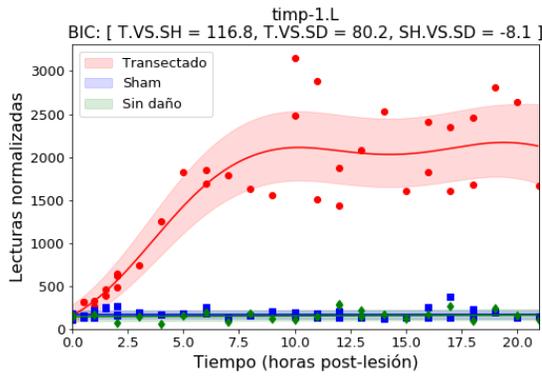
Módulo E2.



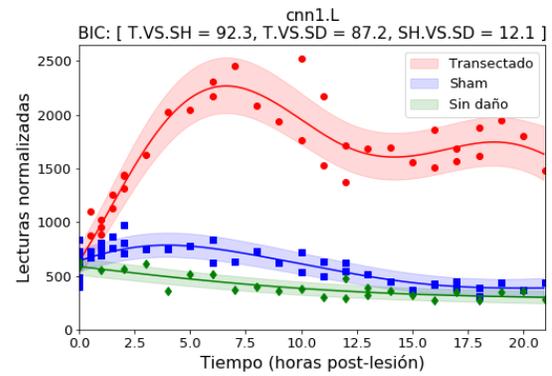
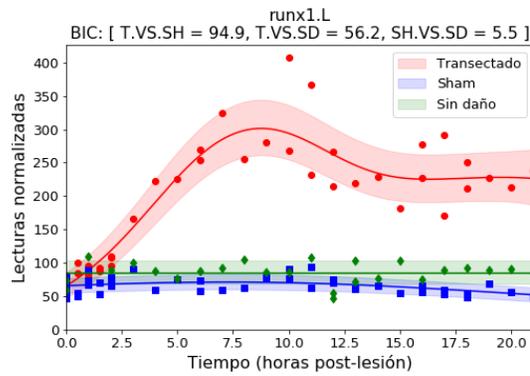
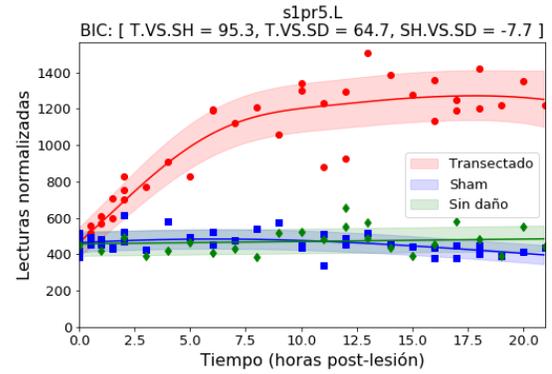
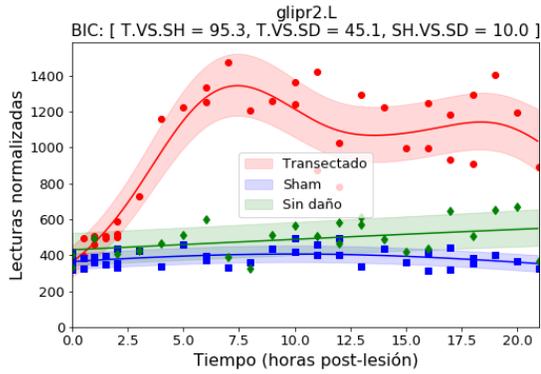
Continuación. Módulo E2.



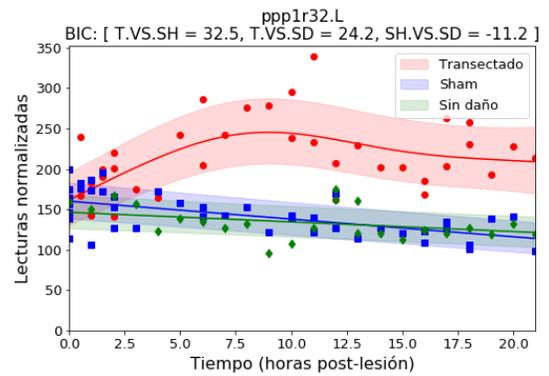
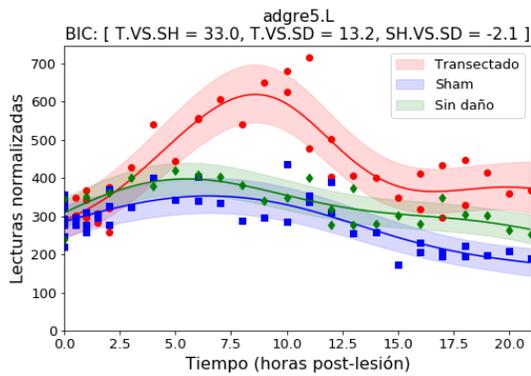
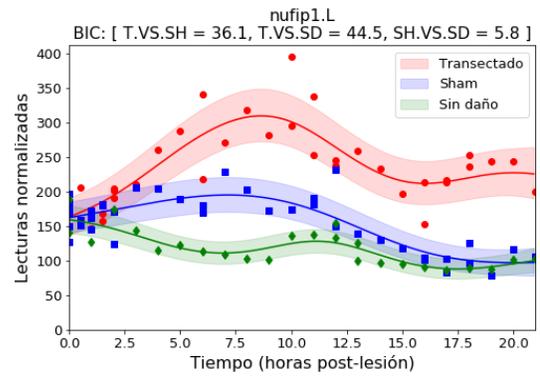
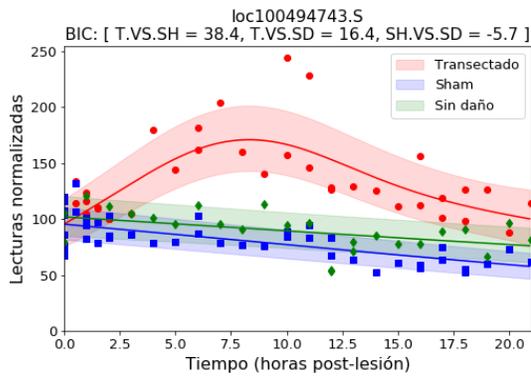
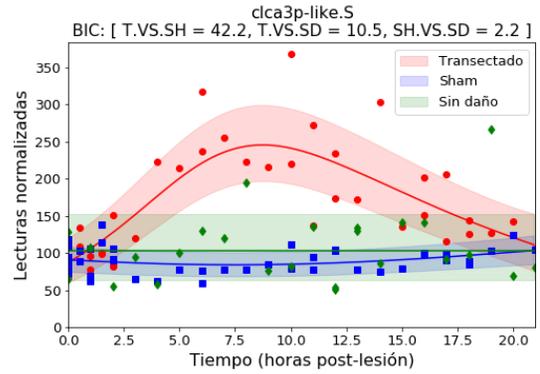
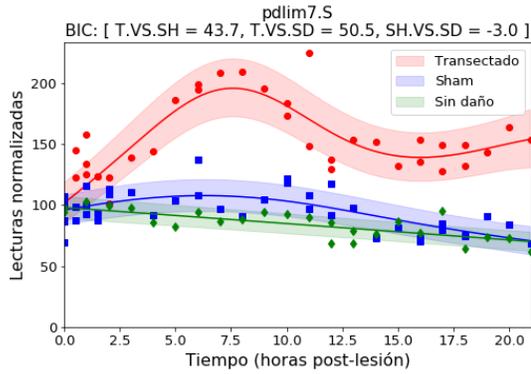
Módulo II.



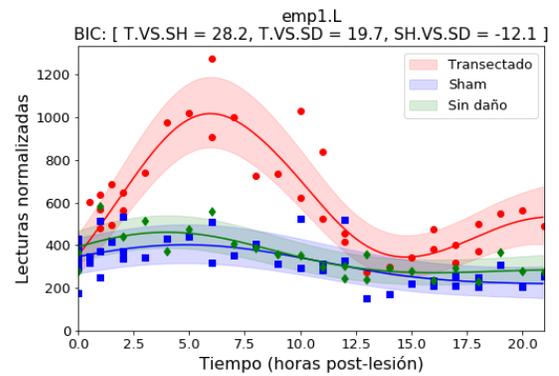
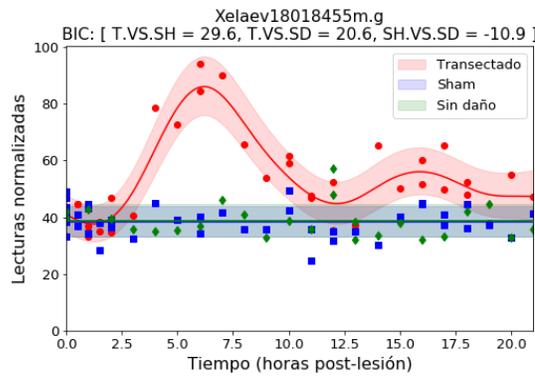
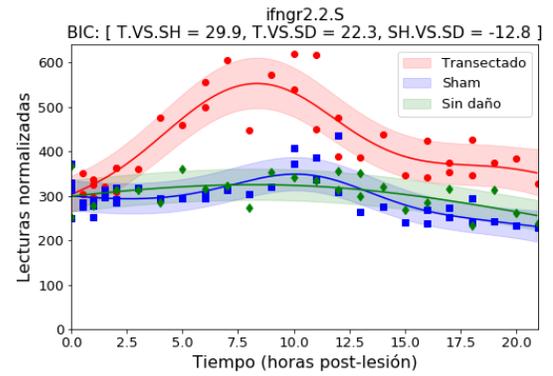
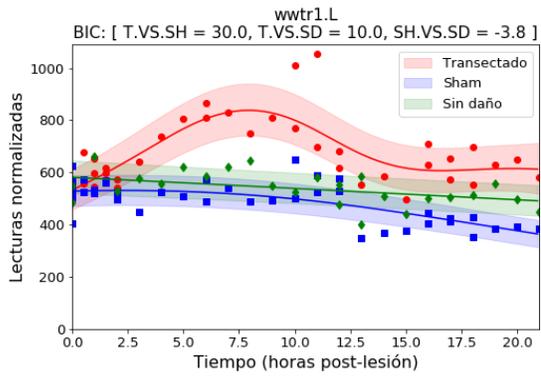
Continuación. Módulo I1.



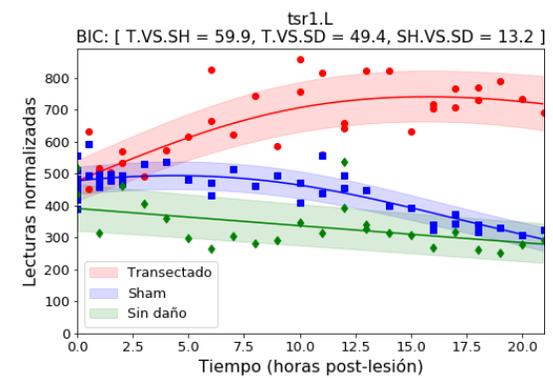
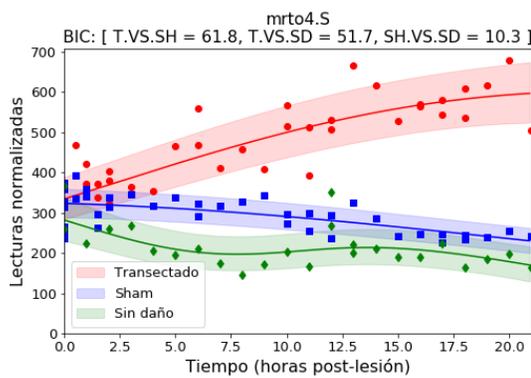
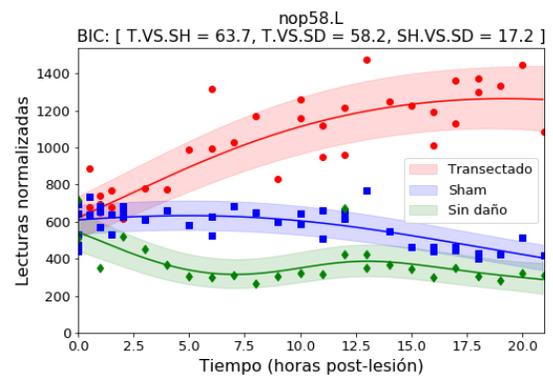
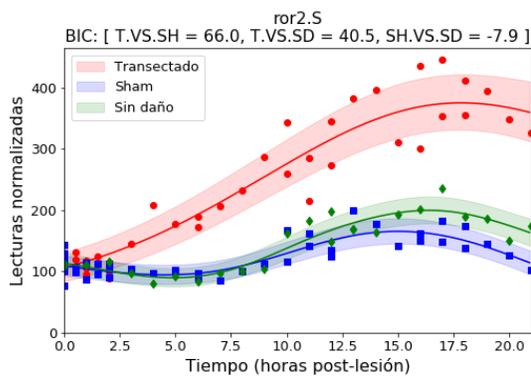
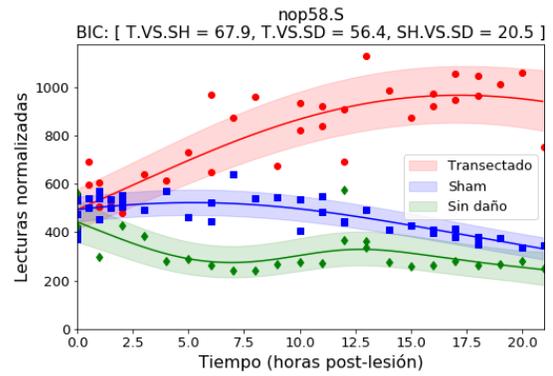
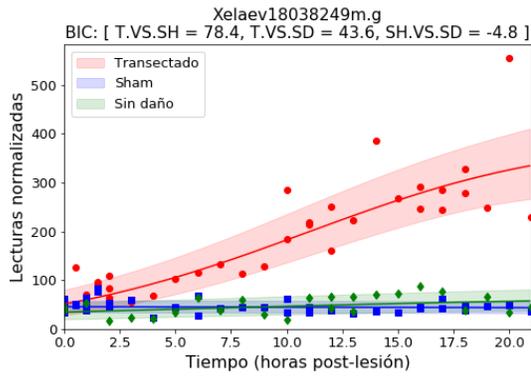
Módulo I2.



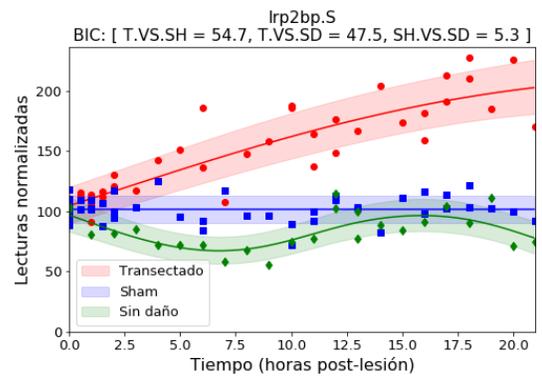
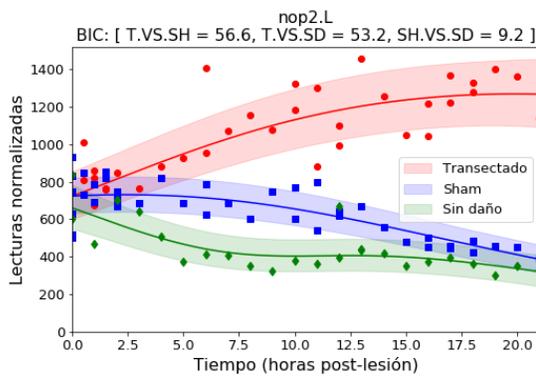
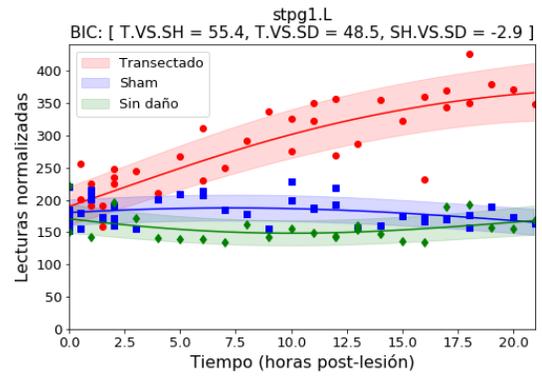
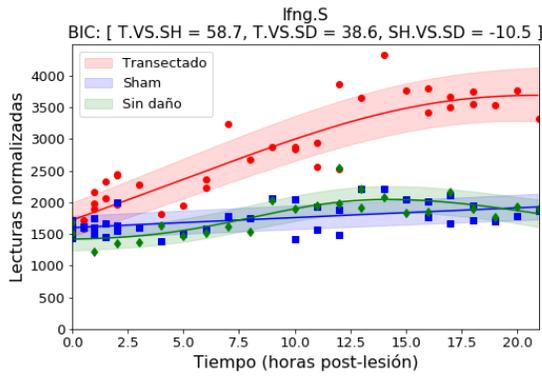
Continuación. Módulo I2.



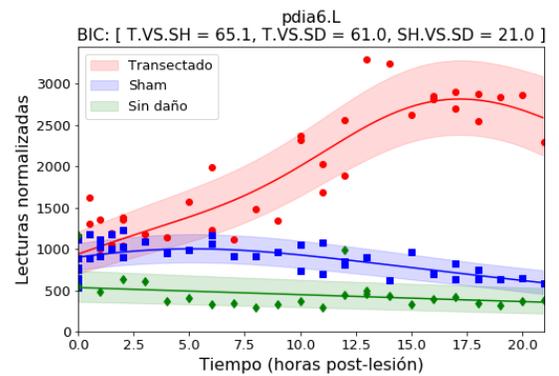
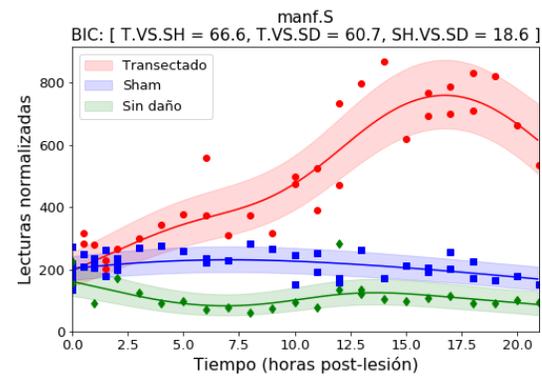
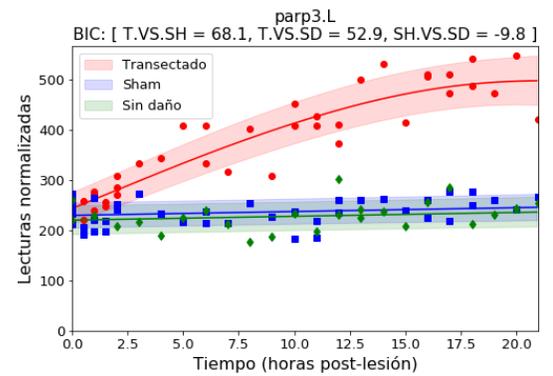
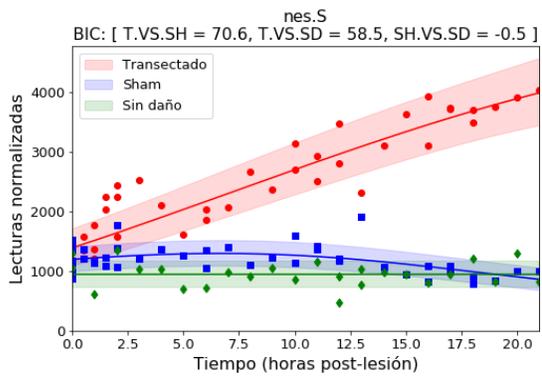
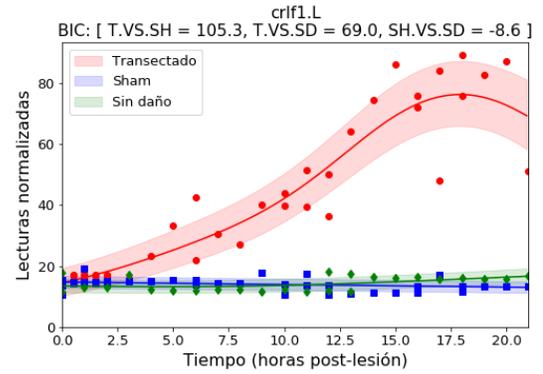
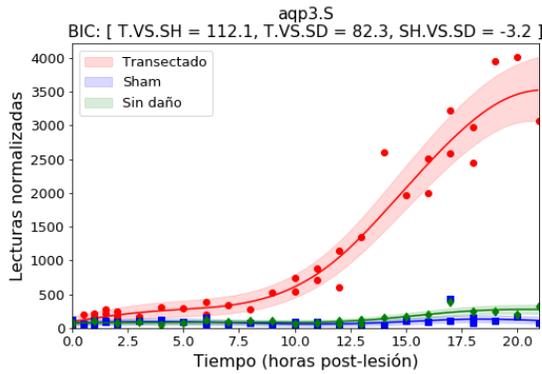
Módulo I3.



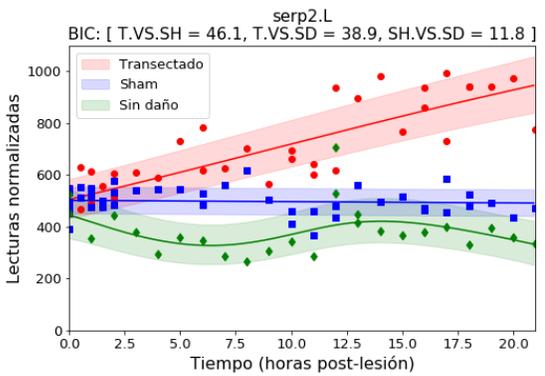
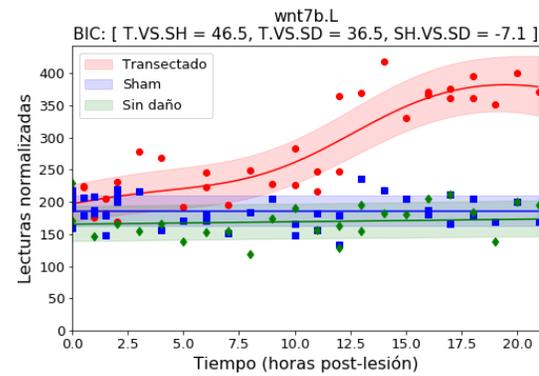
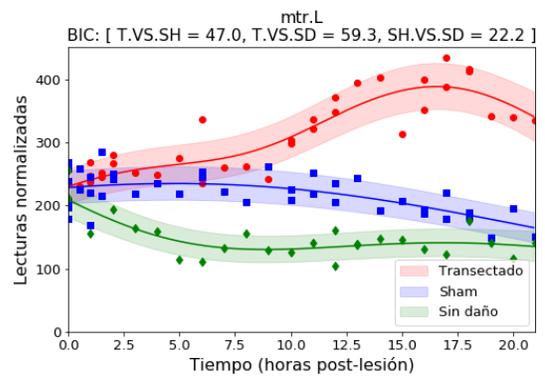
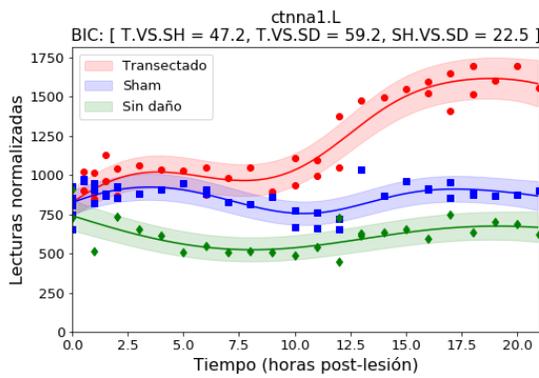
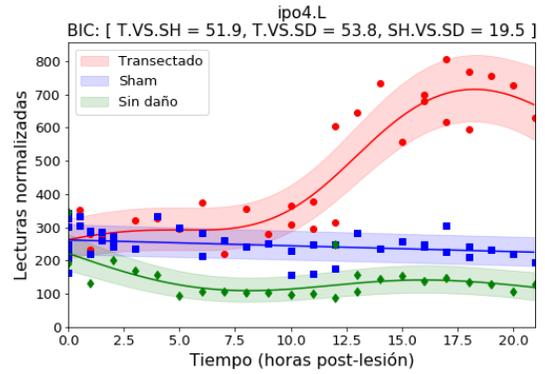
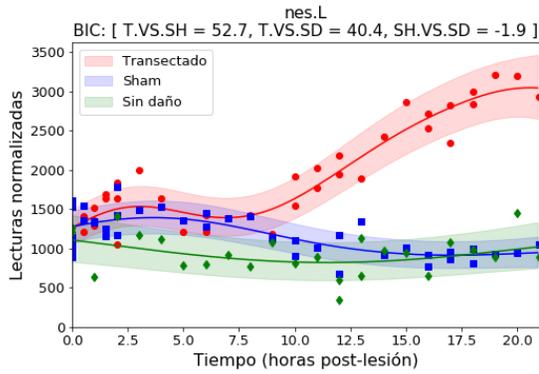
Continuación. Módulo I3.



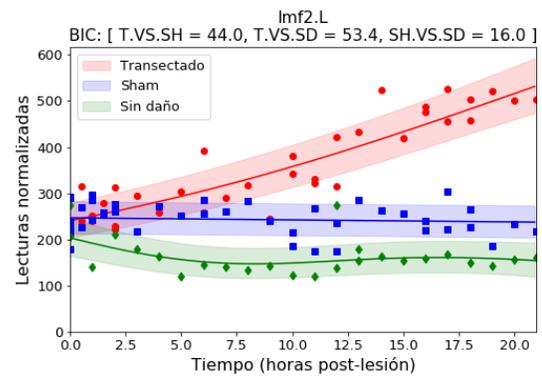
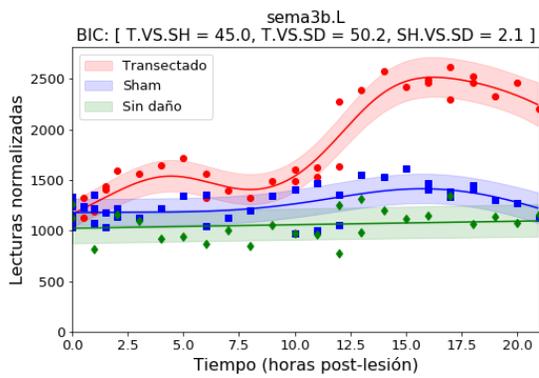
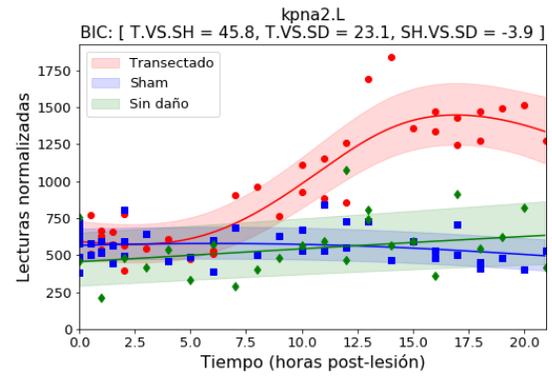
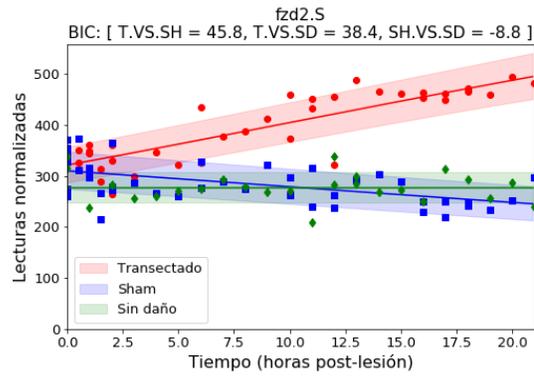
Módulo L1.



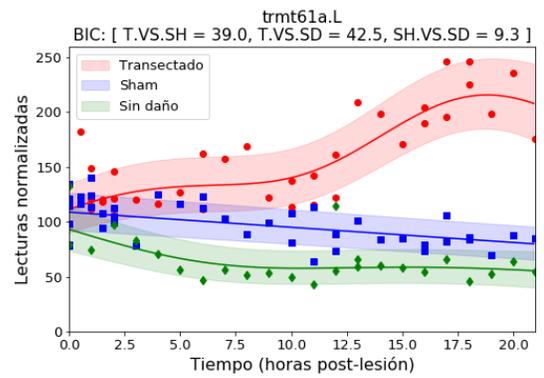
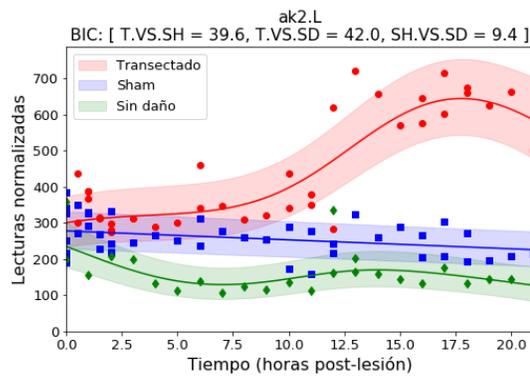
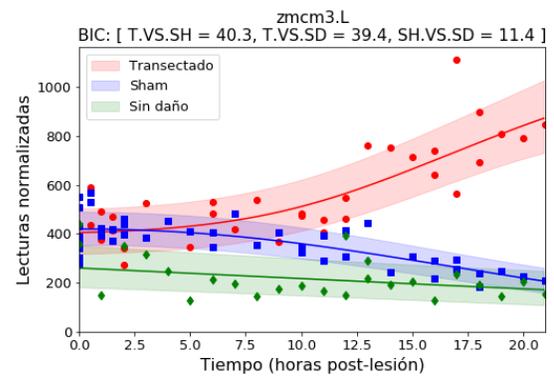
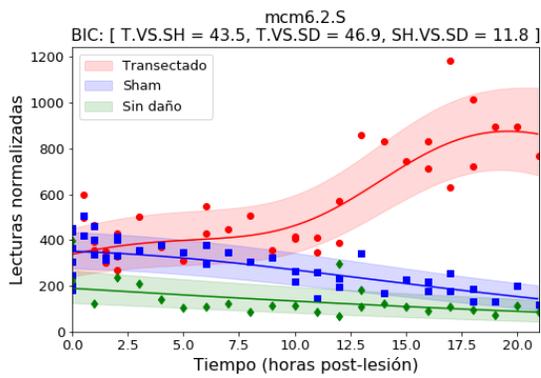
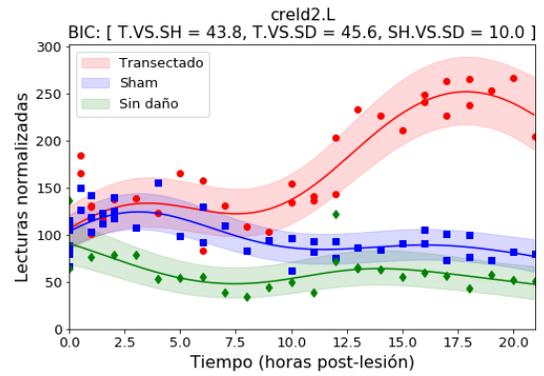
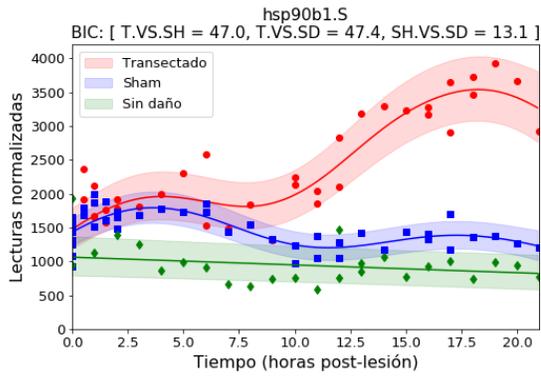
Módulo L2.



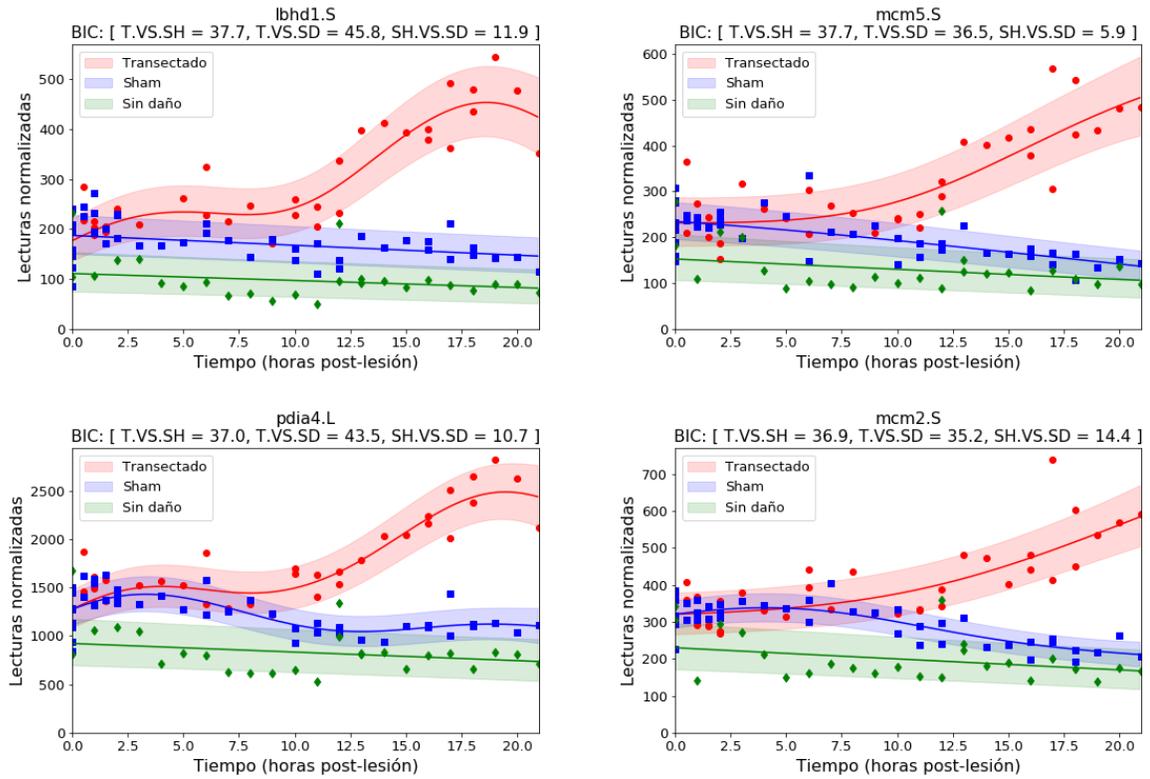
Continuación. Módulo L2.



Módulo L3.



Continuación. Módulo L3.



Apéndice 5. Tabla II. Detalles de términos de ontología génica enriquecidos y representativos en la categoría de procesos biológicos.

Razón-M: Razón de genes del módulo de co-expresión asociados al término GO; **Razón-T:** Razón entre el número de genes asociados al término GO en el módulo de co-expresión y el número de genes asociados al término GO en el transcriptoma basal; Σ **BIC:** sumatoria del BIC de los genes asociados al término GO en el módulo. **valor-x:** producto entre $-\text{LOG}(\text{valor-p})$ y Σ BIC.

Módulo	Término GO	Descripción	$-\text{LOG}(\text{valor-p})$	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
D1	GO:0048754	branching morphogenesis of an epithelial tube	4.22	npnt.L; fhdc1.S; egf.L; nfatc3.S; dlg5.L; fgfr2.S; nfatc3.L; pkd2.L; tmem67.S; sall2.S	10	0.10	0.02	244.2	1031.7	0
D1	GO:0031929	TOR signaling	3.55	loc100493830-like.L; tsc2.S; mapkap1.S; sesn3.L; gatsl1.L; larp1b.L	6	0.06	0.03	121.7	431.9	1
D1	GO:1902275	regulation of chromatin organization	2.14	lpin1.L; hdac5.L; lpin1.S; uhrf2.L; uhrf2.S; pkd2.L	6	0.06	0.02	200.0	427.5	-1
D1	GO:2000371	regulation of DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) activity	2.99	uhrf2.L; uhrf2.S	2	0.02	0.18	50.0	149.3	2
D2	GO:0051384	response to glucocorticoid	3.28	klf9.L; pfkfb1.S; cdo1.L; npas4.S; sgk3.L; sgk2.L	6	0.08	0.02	159.0	522.3	1
D2	GO:0010508	positive regulation of autophagy	2.30	stk32a.L; tp53inp1.S; loc100494506-like.S; map1lc3a.S; ca5b.L; map1lc3b.S	6	0.08	0.01	124.9	286.9	4

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
D2	GO:1901991	negative regulation of mitotic cell cycle phase transition	2.01	ccng2.L; loc100489885.S; ctdsp2.L; MGC75753.L; ctdsp2.S	5	0.06	0.01	120.8	243.2	3
D2	GO:0043402	glucocorticoid mediated signaling pathway	3.21	sgk3.L; sgk2.L	2	0.03	0.18	57.5	184.4	2
D2	GO:1902308	regulation of peptidyl-serine dephosphorylation	3.29	ppp1r15a.L; ppp1r15a.S	2	0.03	0.20	42.6	140.2	0
D3	GO:0042594	response to starvation	3.76	Xelaev18002495m.g; pdk4.S; pdk4.L; slc38a3.L; slc18a2-like.2.S; Xelaev18038264m.g; Xelaev18026445m.g; Xelaev18041485m.g; max.L; adcyap1.L; atg4b.L	11	0.07	0.03	208.7	784.0	1
D3	GO:0032369	negative regulation of lipid transport	5.41	hbp1.L; shh.L; loc100498409-like.L; loc100498409-like.S; irs4.L; hbp1.S	6	0.04	0.10	123.3	666.9	0
D3	GO:0050670	regulation of lymphocyte proliferation	2.67	casp3.L; shh.L; loc100498409-like.L; loc100498409-like.S; irs4.L; pde5a.L; unnamed.L; Xelaev18045282m.g	8	0.05	0.02	122.0	325.6	3
D3	GO:0042130	negative regulation of T cell proliferation	3.45	casp3.L; shh.L; pde5a.L; unnamed.L; Xelaev18045282m.g	5	0.03	0.06	70.5	243.1	2
E1	GO:0048145	regulation of fibroblast proliferation	10.89	fos.S; nfkbia.L; fos.L; loc100490871-like.L; loc100490871-like.S; myc.S; myc.L; itgb3.L; jun.L; jun.S	10	0.21	0.05	349.3	3803.2	0

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
E1	GO:0001890	placenta development	7.36	ptgs2.L; adm.S; junb.S; junb.L; socs3.L; hes1.L; loc101731931.L; socs3.S; Xelaev18021648m.g	9	0.19	0.02	245.4	1805.7	1
E1	GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	6.80	ptgs2.L; egr1.L; myc.S; myc.L; itgb3.L; jun.L; jun.S	7	0.15	0.03	235.8	1604.5	2
E2	GO:0002685	regulation of leukocyte migration	5.35	Xelaev18036272m.g; Xelaev18010901m.g; ptafr.L; ctgf.S; Xelaev18008178m.g; serpine1.L; thbs1.L; Xelaev18009501m.g	8	0.11	0.03	264.9	1416.4	1
E2	GO:0071674	mononuclear cell migration	4.80	Xelaev18036272m.g; ctgf.S; serpine1.L; thbs1.L; Xelaev18009501m.g	5	0.07	0.05	212.5	1020.7	4
E2	GO:0045766	positive regulation of angiogenesis	3.46	ecm1.L; angptl4.S; angptl4.L; serpine1.L; thbs1.L; Xelaev18009501m.g	6	0.08	0.02	265.2	918.0	6
E2	GO:0030193	regulation of blood coagulation	5.39	Xelaev18010901m.g; abat.S; Xelaev18008178m.g; fam46b.L; abat.L; serpine1.L; thbs1.L	7	0.09	0.03	168.8	910.0	2
E2	GO:0031669	cellular response to nutrient levels	3.34	cdkn1a.L; atf3.L; srf.S; cyp27b1.L; angptl4.S; angptl4.L; nuak2.S	7	0.09	0.02	233.8	780.1	5
E2	GO:0042119	neutrophil activation	5.16	Xelaev18036272m.g; Xelaev18010901m.g; ptafr.L; Xelaev18008178m.g; Xelaev18009501m.g	5	0.07	0.06	133.3	687.4	3

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
E2	GO:0006596	polyamine biosynthetic process	6.09	odc1.S; azin1.S; smox.S; azin2.S	4	0.05	0.17	107.3	653.6	0
E2	GO:0030168	platelet activation	3.88	rap2b.L; Xelaev18010901m.g; srf.S; abat.S; Xelaev18008178m.g; actn1.L; abat.L	7	0.09	0.02	163.9	635.5	-1
E2	GO:2001236	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	2.20	Xelaev18034426m.g; atf3.L; g0s2.L; serpine1.L; thbs1.L	5	0.07	0.01	211.5	465.8	7
E2	GO:0034764	positive regulation of transmembrane transport	2.30	odc1.S; azin1.S; Xelaev18043136m.g; ptafr.L; azin2.S	5	0.07	0.01	132.0	304.0	8
E2	GO:0070960	positive regulation of neutrophil mediated cytotoxicity	3.26	Xelaev18010901m.g; Xelaev18008178m.g	2	0.03	0.18	36.4	118.8	9
I1	GO:0007229	integrin-mediated signaling pathway	5.34	itgb6.L; itgb1.L; itga2.L; timp-1.L; timp-1.S; Xelaev18002841m.g; myh9.S; Xelaev18041763m.g; ccm2.S; myh9.L; ctnna1.S	11	0.05	0.05	683.4	3646.6	1
I1	GO:0061028	establishment of endothelial barrier	6.17	s1pr5.L; tnfrsf21.L; f2rl2.S; cldn5.L; jup.L; f2r.S; msn.S; myadm.S; msn.L; myadm.L	10	0.05	0.07	468.9	2895.5	0
I1	GO:0050920	regulation of chemotaxis	3.82	wnt5a.S; s1pr5.L; itga2.L; f2rl2.S; camk1g.L; kdr.L; mst1.L; f2r.S; sema3b.S; f3.L; thbs1.S; prtn3.S; smad3.L	13	0.06	0.03	606.9	2315.8	2

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
I1	GO:0030834	regulation of actin filament depolymerization	4.07	f2rl2.S; myh9.S; f2r.S; msn.S; myh9.L; lima1.L; msn.L	7	0.03	0.06	330.2	1342.9	3
I1	GO:1902904	negative regulation of supramolecular fiber organization	2.74	s1pr5.L; myh9.S; msn.S; myh9.L; myadm.S; lima1.L; msn.L; mid1.L; myadm.L	9	0.04	0.03	455.5	1246.2	5
I1	GO:0006911	phagocytosis, engulfment	4.05	itga2.L; f2rl2.S; myh9.S; f2r.S; myh9.L; thbs1.S	6	0.03	0.08	305.2	1234.9	4
I2	GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis	5.49	znf622.S; noc2l.L; rrp15.L; ppan.S; ppan.L	5	0.11	0.04	87.2	479.0	0
I2	GO:0006364	rRNA processing	3.61	utp15.L; wdr75.S; nop14.L; ddx54.L; naf1.L; rrp15.L	6	0.13	0.01	115.8	418.2	-1
I2	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	2.92	nufip1.L; ppan.S; eif3j.S; srsf10.S; ppan.L	5	0.11	0.01	99.7	290.8	1
I3	GO:0009451	RNA modification	12.58	fbl.L; nop58.L; nop58.S; pus1.S; nop2.L; nop56.L; nsun2.S; nhp2.L; ftsj3.L; syncrip.S; dkc1.L; syncrip.L; trmt6.S; fbl.S; thumpd1.S; thumpd3.L; Xelaev18019094m.g; ssb.S	18	0.08	0.10	692.4	8711.2	1
I3	GO:0000469	cleavage involved in rRNA processing	8.80	npm3.S; tsr1.L; nhp2.L; rrs1.L; gn13.L; abt1.L; rrs1.S; bop1.L; bms1.L	9	0.04	0.18	335.3	2950.3	2
I3	GO:0043044	ATP-dependent chromatin remodeling	6.41	npm3.S; ruvbl1.S; ruvbl1.L; hdac1.L; Xelaev18047430m.g; Xelaev18045052m.g; smarca5.L; anp32c.S; hdac1.S; smarca5.S	10	0.04	0.08	351.0	2249.9	3

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
I3	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	3.06	mrto4.S; npm3.S; tsr1.L; ruvbl1.S; ruvbl1.L; prmt5.S; brix1.L; rpf2.S; mrto4.L; abt1.L; pwp2.S; bms1.L	12	0.05	0.03	486.8	1488.0	4
L1	GO:0006364	rRNA processing	10.55	Xelaev18003918m.g; heatr1.S; nhp2.S; wdr12.L; skiv2l2.S; utp15.S; npm3.L; rrp9.S; ddx49.S; utp6.L; exosc10.L; loc100491278-like.L; rrp9.L; wdr3.S; loc100490380-like.L; gar1.S; bop1.S; xrn2.S; shq1.L; ddx56.L; utp4.S; dimt1.L; fcf1.S; noc4l.L; riok2.L	25	0.10	0.06	749.3	7902.8	0
L1	GO:0009116	nucleoside metabolic process	3.72	qtrt1.S; ppat.L; nme5.L; gmps.L; umps.L; ptger2.S; Xelaev18012070m.g; entpd7.L; nme9.L; pdcl.S	10	0.04	0.04	253.7	944.8	1
L1	GO:0048546	digestive tract morphogenesis	2.57	stra6.L; ctnnb1.L; sfrp2.S; hsp90b1.L; wnt5a.L; stip1.L; sfrpx.S; jup.S	8	0.03	0.04	337.0	866.7	2
L2	GO:0006607	NLS-bearing protein import into nucleus	9.32	kpna4.S; kpna2.L; ipo4.L; kpnb1.S; kpna4.L; kpnb1.L; nup35.L; kpna6.L	8	0.05	0.18	234.1	2181.7	0

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
L2	GO:0006364	rRNA processing	3.14	rarg-like.2.L; nol11.S; utp20.L; wdr46.L; wdr36.L; rcl1.S; mdn1.L; nol8.L; exosc4.S; suv39h1.L	10	0.07	0.02	248.6	780.2	1
L2	GO:0017145	stem cell division	4.12	wnt7b.L; fzd2.S; smad1.L; fzd2.L; tia1.L; pelo.L; dock6-like.L	7	0.05	0.04	188.6	777.4	2
L2	GO:0090305	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	3.25	kpnb1.S; utp20.L; ern1.L; rcl1.S; kpnb1.L; hspa14.L; cpsf2.L; exosc4.S; pelo.L	9	0.06	0.03	185.1	601.1	-1
L2	GO:0072089	stem cell proliferation	2.37	ctnna1.L; wnt7b.L; nes.L; ctnnb1.S; fzd3.L; dync1h1.S; dock6-like.L; smarcd1.L	8	0.05	0.02	213.6	505.8	3
L2	GO:0043550	regulation of lipid kinase activity	3.82	rhog-like.1.S; src.S; src.L; rbl1.L; rbl1.S; pik3r2-like.S	6	0.04	0.05	125.0	477.5	6
L2	GO:0006610	ribosomal protein import into nucleus	3.93	ipo4.L; kpnb1.S; kpnb1.L	3	0.02	0.20	110.4	434.2	4
L2	GO:0034446	substrate adhesion-dependent cell spreading	2.23	rhog-like.1.S; pxn.S; src.S; src.L; fzd2.S; fzd2.L	6	0.04	0.02	181.6	404.2	7
L2	GO:0002066	columnar/cuboidal epithelial cell development	2.44	rhog-like.1.S; kpnb1.S; smad1.L; kpnb1.L; cdk4.S; dync1h1.S; sec24b.S	7	0.05	0.02	141.7	346.0	-1
L2	GO:0007172	signal complex assembly	3.84	pxn.S; src.S; src.L	3	0.02	0.19	81.7	313.9	5
L2	GO:0071680	response to indole-3-methanol	2.57	ctnna1.L; ctnnb1.S	2	0.01	0.17	57.4	147.6	8

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
L3	GO:0006270	DNA replication initiation	15.96	mcm6.2.S; zmcm3.L; mcm5.S; mcm2.S; mcm2.L; mcm4.L; mcm7.L; mcm4.S; mcm6.2.L; mcm5.L; orc1.L; cdk2.S; mcm7.S; orc6.L	14	0.07	0.24	416.2	6643.6	0
L3	GO:0006611	protein export from nucleus	5.06	chchd4.L; Xelaev18010463m.g; abce1.S; cpsf2.S; srsf2.L; eif6.S; xpo1.L; pcid2.S; Xelaev18019056m.g; chchd4.S; nup93.L; cse1l.L; srsf7.S	13	0.06	0.04	242.2	1225.7	1
L3	GO:0000077	DNA damage checkpoint	4.56	Xelaev18037790m.g; Xelaev18036061m.g; stt3a.L; stt3a.S; polr2h.L; polr2f.S; mcm7.L; Xelaev18015757m.g; cdk2.S; e2f1.L; mcm7.S; e2f1.S; rpa2.S	13	0.06	0.04	250.2	1141.7	2

Apéndice 6. Tabla III. Detalles de términos de ontología génica enriquecidos y representativos en la categoría de función molecular.

Razón-M: Razón de genes del módulo de co-expresión asociados al término GO; **Razón-T:** Razón entre el número de genes asociados al término GO en el módulo de co-expresión y el número de genes asociados al término GO en el transcriptoma basal; Σ **BIC:** sumatoria del BIC de los genes asociados al término GO en el módulo. **valor-x:** producto entre $-\text{LOG}(\text{valor-p})$ y Σ BIC.

Módulo	Término GO	Descripción	$-\text{LOG}(\text{valor-p})$	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
D1	GO:0015081	sodium ion transmembrane transporter activity	2.39	Xelaev18001815m.g; Xelaev18002572m.g; slc5a7.S; pkd2.L; slc5a7.L	5	0.05	0.02	140.7	336.0	0
D2	GO:0016791	phosphatase activity	2.95	pfkfb1.S; ppp1r15a.S; ppip5k1.S; pfkfb4.L; ppp2cb.S; ctdsp2.L; ctdsp2.S	7	0.09	0.01	160.8	475.0	1
D2	GO:0070513	death domain binding	4.61	dapl1.S; loc100489885.S; dapl1.L	3	0.04	0.18	44.0	202.8	0
D3	GO:0005539	glycosaminoglycan binding	3.84	shh.L; acan.L; col5a1- like.L; dpysl3.S; loc101731931.S; unnamed.L; dpysl3.L; pcsk1.L; crispld2.L; gns.S	10	0.06	0.03	174.9	671.8	0
D3	GO:0047485	protein N-terminus binding	2.65	loc549366.S; tbl1x.L; mecp2.S; tbl1x.S; tsc1.L; sgf29.S; mecpl2.L	7	0.04	0.03	128.1	338.9	1
D3	GO:1901981	phosphatidylinositol phosphate binding	2.02	wipi1.L; cfl2.L; hcn2.S; unnamed.L; hip1.L; hip1.S; rph3al.S	7	0.04	0.02	105.9	214.3	2
E1	GO:0001046	core promoter sequence-specific DNA binding	7.01	fos.S; fos.L; loc100490871-like.L; loc100490871-like.S; egr1.L; myc.S; myc.L; klf10.S	8	0.17	0.03	248.1	1739.0	1

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
E1	GO:0070412	R-SMAD binding	8.39	fos.S; fos.L; loc100490871-like.L; loc100490871-like.S; jun.L; jun.S	6	0.13	0.09	241.4	2024.2	0
E1	GO:0001227	transcriptional repressor activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	3.88	btg2.S; nfkbia.L; ets2.L; atf3.S; bhlhe40.L; hes1.L	6	0.13	0.01	111.3	431.2	2
E2	GO:0042979	ornithine decarboxylase regulator activity	5.34	odc1.S; azin1.S; azin2.S	3	0.04	0.27	91.0	485.5	-1
E2	GO:0015057	thrombin-activated receptor activity	3.29	Xelaev18010901m.g; Xelaev18008178m.g	2	0.03	0.18	36.4	119.9	-1
I1	GO:0048018	receptor ligand activity	3.40	wnt5a.S; timp-1.L; manf.L; timp-1.S; ccl34.S; metrnl.S; sema3b.S; sfrp2.L; metrnl.L; inhba.L; hbegf.S; grp.L; tnfrsf11b.S	13	0.06	0.03	737.6	2509.3	0
I1	GO:0005178	integrin binding	3.45	itgb6.L; itgb1.L; s1pr5.L; itga2.L; kdr.L; sfrp2.L; egfl6.S; thbs1.S; actn1.S	9	0.04	0.04	526.2	1813.5	1
I1	GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	2.74	mmp13.S; prss23.S; mmp19.L; mst1.L; plat.L; loc100493411.S; prtn3.S	7	0.03	0.04	320.7	880.0	2
I3	GO:0004386	helicase activity	6.66	eif4a1.L; ddx27.L; eif4a1.S; ruvbl1.S; ddx24.L; ruvbl1.L; dhx37.L; g3bp1.L; g3bp1.S; smarca5.L; dhx38.L; smarca5.S; c10orf2.L	13	0.06	0.06	487.4	3248.2	3

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
I3	GO:0030515	snoRNA binding	12.80	nop58.L; nop58.S; diexf.L; tbl3.L; nop56.L; tsr1.L; nhp2.L; diexf.S; dkc1.L; pwp2.S; bms1.L	11	0.05	0.27	484.4	6201.7	0
I3	GO:0003729	mRNA binding	3.11	Xelaev18012630m.g; eif4a1.L; eif4a1.S; g3bp1.L; g3bp1.S; nifk.S; syncrip.S; syncrip.L; ncbp2.L; kiaa0020.S; ssb.S; elavl1.S	12	0.05	0.03	424.3	1320.7	-1
I3	GO:0140097	catalytic activity, acting on DNA	3.63	hmga2.S; ruvbl1.S; ruvbl1.L; ftsj3.L; g3bp1.L; g3bp1.S; dkc1.L; prmt5.S; smarca5.L; smarca5.S; c10orf2.L	11	0.05	0.04	362.6	1315.1	-1
I3	GO:0004004	ATP-dependent RNA helicase activity	5.60	eif4a1.L; ddx27.L; eif4a1.S; ddx24.L; dhx37.L; g3bp1.L; g3bp1.S; dhx38.L	8	0.03	0.09	329.8	1847.2	5
I3	GO:0008173	RNA methyltransferase activity	7.85	fbl.L; nop2.L; nsun2.S; ftsj3.L; prmt5.S; setd6.L; fbl.S; mettl13.S; thumpd3.L; Xelaev18019094m.g	10	0.04	0.11	306.1	2402.6	2
I3	GO:0140101	catalytic activity, acting on a tRNA	5.46	farsa.S; nsun2.S; ftsj3.L; prmt5.S; pdcl3.L; farsa.L; sgpp2.L; setd6.L; mettl13.S; thumpd3.L; Xelaev18019094m.g	11	0.05	0.06	304.6	1661.8	6
I3	GO:0001094	TFIID-class transcription factor binding	8.41	fbl.L; nop58.L; nop58.S; ruvbl1.S; ruvbl1.L; fbl.S	6	0.03	0.40	300.6	2527.5	1

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
L2	GO:0030331	estrogen receptor binding	3.34	ctnnb1.S; src.S; dnmt1.S; src.L; pik3r2-like.S	5	0.03	0.05	106.2	355.1	2
L3	GO:0140097	catalytic activity, acting on DNA	8.06	prmt5.L; mcm6.2.S; zmcm3.L; fen1.S; mcm5.S; mcm2.S; aptx.L; mcm2.L; mcm4.L; mcm7.L; mcm4.S; mcm6.2.L; mcm5.L; nme4.S; dnmt1.L; mcm7.S	16	0.08	0.05	457.1	3684.5	0
L3	GO:0008168	methyltransferase activity	6.72	wdr4.S; ntmt1.S; Xelaev18037790m.g; Xelaev18036061m.g; prmt5.L; trmt61a.L; hemk1.L; wdr77.S; Xelaev18024234m.g; prmt3.S; Xelaev18022556m.g; mettl1.L; mettl21b.L; Xelaev18022560m.g; rbbp4.L; rbbp4.S; comt.L; dnmt1.L	18	0.09	0.04	374.3	2516.0	2
L3	GO:0003688	DNA replication origin binding	8.79	mcm5.S; mcm2.S; mcm2.L; mcm5.L; hspd1.S; orc6.L	6	0.03	0.40	162.9	1431.6	1

Apéndice 7. Tabla IV. Detalles de términos de ontología génica enriquecidos y representativos en la categoría de componente celular.

Razón-M: Razón de genes del módulo de co-expresión asociados al término GO; **Razón-T:** Razón entre el número de genes asociados al término GO en el módulo de co-expresión y el número de genes asociados al término GO en el transcriptoma basal; Σ **BIC:** sumatoria del BIC de los genes asociados al término GO en el módulo. **valor-x:** producto entre $-\text{LOG}(\text{valor-p})$ y Σ BIC.

Módulo	Término GO	Descripción	$-\text{LOG}(\text{valor-p})$	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
D1	GO:0044853	plasma membrane raft	2.09	tsc2.S; lrp8.S; slc5a7.S; slc5a7.L; lipe.L	5	0.05	0.02	105.7	220.9	-1
D1	GO:1903349	omegasome membrane	2.95	ulk2.L; ulk1.S	2	0.02	0.18	66.7	196.9	-1
D1	GO:1990462	omegasome	2.95	ulk2.L; ulk1.S	2	0.02	0.18	66.7	196.9	-1
D3	GO:0043679	axon terminus	3.96	slc18a2-like.2.S; hcn2.S; dpysl3.S; Xelaev18038264m.g; rapgef3.L; dbh.L; dpysl3.L; Xelaev18041485m.g; adcyp1.L; pnoc.S; ptprn.S; calca.L	12	0.07	0.03	206.8	818.4	0
I1	GO:0030863	cortical cytoskeleton	8.61	cdh2.L; Xelaev18002841m.g; myh9.S; cldn5.L; vcl.S; Xelaev18041763m.g; msn.S; pdlim7.L; sept2.S; myh9.L; myadm.S; actn1.S; Xelaev18020683m.g; msn.L; Xelaev18018158m.g; myadm.L	16	0.07	0.06	697.5	6003.6	1

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
I1	GO:0098862	cluster of actin-based cell projections	6.10	slc9a3r1.L; homer2.S; slc9a3r1.S; Xelaev18002841m.g; myh9.S; vcl.S; Xelaev18041763m.g; msn.S; myh9.L; lima1.L; soat1.S; actn1.S; Xelaev18020683m.g; msn.L; Xelaev18018158m.g	15	0.07	0.04	632.4	3859.7	-1
I1	GO:0031528	microvillus membrane	9.35	itgb6.L; slc9a3r1.L; slc9a3r1.S; jup.L; msn.S; Xelaev18020683m.g; msn.L; Xelaev18018158m.g	8	0.04	0.24	378.4	3539.4	0
I1	GO:0001726	ruffle	4.41	itgb6.L; itgb1.L; rab34.L; myh9.S; msn.S; plekho1.S; pdlim7.L; myh9.L; myadm.S; snx5.L; actn1.S; msn.L; cyth1-like.S; myadm.L	14	0.06	0.03	669.6	2954.0	2
I1	GO:0032432	actin filament bundle	4.87	Xelaev18002841m.g; myh9.S; vcl.S; Xelaev18041763m.g; pdlim7.L; cnn1.L; myh9.L; cnn1.S; lima1.L; actn1.S	10	0.05	0.05	568.8	2769.1	5
I1	GO:0031091	platelet alpha granule	3.14	itgb6.L; timp-1.L; timp-1.S; loc100493411.S; thbs1.S; actn1.S	6	0.03	0.05	441.4	1387.6	7
I1	GO:0032154	cleavage furrow	3.72	itgb1.L; myh9.S; msn.S; sept2.S; myh9.L; lima1.L; msn.L	7	0.03	0.05	352.9	1311.3	4

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
I1	GO:0005884	actin filament	3.84	Xelaev18002841m.g; vcl.S; Xelaev18041763m.g; pawr.S; dnajb9.L; pdlim7.L; actn1.S; Xelaev18020683m.g; Xelaev18018158m.g; Xelaev18026141m.g	10	0.05	0.04	338.0	1299.1	6
I1	GO:0005915	zonula adherens	5.24	Xelaev18037758m.g; vcl.S; jup.L; actn1.S; ctnna1.S	5	0.02	0.17	220.2	1154.5	3
I2	GO:0030684	preribosome	6.59	znf622.S; nop14.L; noc2l.L; rrp15.L; ppan.S; ppan.L	6	0.12	0.05	111.3	733.5	0
I2	GO:0001725	stress fiber	4.36	pdlim7.S; sept9.L; pdlim4.S; tpm4.S; tpm4.L	5	0.10	0.03	115.7	504.4	1
I3	GO:0030684	preribosome	28.13	fbl.L; nop58.L; nop58.S; mrto4.S; diexf.L; tbl3.L; rsl1d1.L; wdr12.S; nop56.L; tsr1.L; rsl1d1.S; rrp1b.L; ftsj3.L; rrs1.L; diexf.S; rrp1b.S; ngdn.L; utp18.L; dcaf13.S; mrto4.L; rrs1.S; fbl.S; bop1.L; dcaf13.L; pwp2.S; bms1.L; mak16.S	27	0.12	0.22	1086.2	30551.1	0
I3	GO:0044452	nucleolar part	13.57	fbl.L; utp4.L; nop58.L; nop58.S; tbl3.L; wdr12.S; twistnb.L; npm3.S; nop56.L; nhp2.L; dkc1.L; utp18.L; fbl.S; bop1.L; cd3eap-like.L; pwp2.S	16	0.07	0.14	669.6	9089.9	1

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
I3	GO:1904949	ATPase complex	3.92	abcf2.L; ruvbl1.S; ruvbl1.L; abcb6.L; hdac1.L; smarca5.L; hdac1.S; ino80b.S; smarca5.S	9	0.04	0.05	306.6	1201.2	-1
I3	GO:0034708	methyltransferase complex	3.64	ruvbl1.S; ruvbl1.L; wdr82.L; hdac1.L; prmt5.S; Xelaev18047430m.g; Xelaev18045052m.g; trmt6.S; hdac1.S	9	0.04	0.04	298.9	1088.7	2
I3	GO:0016363	nuclear matrix	3.02	xpot.S; npm3.S; ruvbl1.S; ruvbl1.L; lmn1.S; ppid.L; lmnb1.L; anp32c.S; prpf40a.S	9	0.04	0.04	306.2	924.0	3
I3	GO:0070603	SWI/SNF superfamily-type complex	3.15	ruvbl1.S; ruvbl1.L; hdac1.L; smarca5.L; hdac1.S; ino80b.S; smarca5.S	7	0.03	0.05	225.1	709.5	-1
I3	GO:1905368	peptidase complex	2.13	wfs1.L; psme3.S; psme3.L; txn1.S; txn1.L; sec11a.L	6	0.03	0.03	173.1	368.3	4
L1	GO:0034663	endoplasmic reticulum chaperone complex	11.54	sdf2l1.L; pdia6.L; hyou1.L; hspa5.S; hsp90b1.L; sdf2l1.S; pdia6.S; sdf2.S; hyou1.S	9	0.04	0.36	419.0	4833.4	0
L1	GO:0030684	preribosome	6.99	Xelaev18003918m.g; heatr1.S; wdr12.L; nip7.L; rrp9.S; utp6.L; rrp9.L; wdr3.S; bop1.S; fcf1.S; noc4l.L	11	0.04	0.09	343.4	2399.2	1
L2	GO:0005643	nuclear pore	5.91	kpna4.S; kpna2.L; ipo4.L; kpn1.S; kpna4.L; kpn1.L; nup35.L; kpna6.L	8	0.05	0.06	234.1	1382.5	0

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
L2	GO:0005840	ribosome	2.92	serp2.L; ddx3x.L; srp68.S; ddx3x.S; gcn1.S; hspa14.L; mrpl14.L; gcn1.L; metap1.L	9	0.06	0.02	194.6	567.4	-1
L2	GO:0005875	microtubule associated complex	2.70	pxn.S; prpf19.L; emc8.S; kpnb1.S; kif5b.S; kpnb1.L; bub3.L; dync1h1.S; bub3.S	9	0.06	0.02	190.5	514.2	1
L2	GO:0036464	cytoplasmic ribonucleoprotein granule	2.19	rhog-like.1.S; mex3c.S; ddx3x.L; kpnb1.S; kpnb1.L; tia1.L; ddx3x.S	7	0.05	0.02	170.4	372.4	2
L3	GO:0042555	MCM complex	18.73	mcm6.2.S; zmcm3.L; mcm5.S; mcm2.S; mcm2.L; mcm4.L; mcm7.L; mcm4.S; mcm6.2.L; mcm5.L; mcm7.S	11	0.05	0.65	363.6	6811.3	-1
L3	GO:0000781	chromosome, telomeric region	12.49	stt3a.L; stt3a.S; mcm6.2.S; zmcm3.L; fen1.S; mcm5.S; mcm2.S; mcm2.L; mcm4.L; mcm7.L; mcm4.S; nhp2l1.S; mcm6.2.L; mcm5.L; orc1.L; cdk2.S; mcm7.S; rpa2.S	18	0.09	0.09	493.5	6163.6	0
L3	GO:0005788	endoplasmic reticulum lumen	5.21	hsp90b1.S; ganab.L; ctsc.S; pdia4.L; txndc5.S; p4hb.L; gpx7.S; cln6.S; Xelaev18019056m.g; ganab.S; pdia3.S; ugg2.L; lepre1.L	13	0.06	0.04	324.5	1690.2	3

Módulo	Término GO	Descripción	-LOG(valor-p)	Genes enriquecidos	# genes	Razón-M	Razón-C	Σ BIC	valor-x	Grupo GO
L3	GO:0031970	organelle envelope lumen	5.73	chchd4.L; ak2.L; ak2.S; ngfr.S; chchd4.S; pdia3.S; rexo2.L; nme4.S; ngfr.L; stoml2.L	10	0.05	0.06	216.1	1238.9	1
L3	GO:0034708	methyltransferase complex	4.04	Xelaev18037790m.g; Xelaev18036061m.g; prmt5.L; trmt61a.L; wdr77.S; Xelaev18016354m.g; mettl1.L; rbbp4.L; rbbp4.S	9	0.04	0.04	215.4	870.8	2
L3	GO:0042470	melanosome	2.63	hsp90b1.S; ganab.L; pdia4.L; p4hb.L; ganab.S; pdia3.S; itgb5.L	7	0.03	0.03	183.7	482.8	5
L3	GO:0030684	preribosome	3.13	ebna1bp2.L; wdr36.S; nob1.S; eif6.S; nhp2l1.S; fcf1.L	6	0.03	0.05	128.2	400.9	4

Apéndice 8. Tabla V. Tabla de Resultados del análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG.

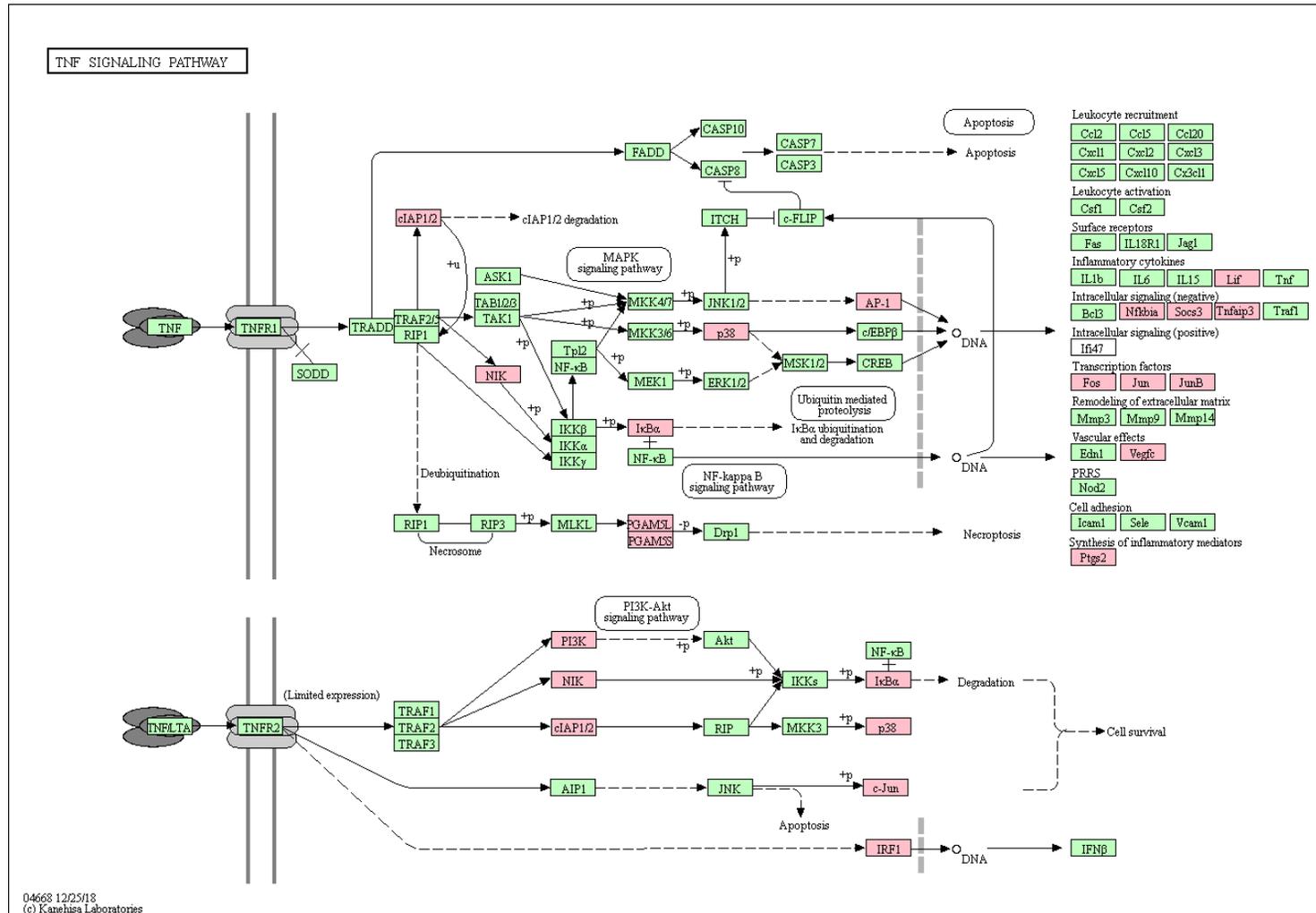
Razón-M: razón entre el número de genes asociados a la vía de señalización en el módulo y el número total de genes únicos mapeados al proteoma humano para el mismo módulo. **Razón-K:** razón entre el número de genes asociados por KEGG a la vía de señalización y el número total de genes asociados a las diferentes vías de señalización KEGG.

Módulo	ID Vía	Descripción	Razón-M	Razón-K	FDR	Genes
D1	hsa04150	mTOR signaling pathway	7/39	215/10797	0.00	ULK1, ULK2, CASTOR2, LPIN1, DEPTOR, MAPKAP1, TSC2
D2	hsa04216	Ferroptosis	3/27	68/10797	0.03	MAP1LC3B, MAP1LC3A, SLC40A1
E1	hsa04668	TNF signaling pathway	7/25	154/10797	0.00	JUNB, VEGFC, JUN, PTGS2, FOS, NFKBIA, SOCS3
E1	hsa04380	Osteoclast differentiation	5/25	179/10797	0.00	JUNB, JUN, FOS, NFKBIA, SOCS3
E1	hsa04657	IL-17 signaling pathway	4/25	122/10797	0.01	JUN, PTGS2, FOS, NFKBIA
E1	hsa05166	Human T-cell leukemia virus 1 infection	6/25	380/10797	0.01	ETS2, EGR1, JUN, MYC, FOS, NFKBIA
E1	hsa05140	Leishmaniasis	4/25	145/10797	0.01	JUN, PTGS2, FOS, NFKBIA
E1	hsa04010	MAPK signaling pathway	6/25	441/10797	0.01	VEGFC, DUSP6, JUN, MYC, DUSP5, FOS
E1	hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	5/25	285/10797	0.01	JUN, PTGS2, MYC, FOS, NFKBIA
E1	hsa04210	Apoptosis	4/25	201/10797	0.01	TNFRSF10B, JUN, FOS, NFKBIA
E1	hsa04926	Relaxin signaling pathway	4/25	202/10797	0.01	VEGFC, JUN, FOS, NFKBIA
E1	hsa05224	Breast cancer	4/25	207/10797	0.01	JUN, HES1, MYC, FOS
E1	hsa04662	B cell receptor signaling pathway	3/25	108/10797	0.02	JUN, FOS, NFKBIA
E1	hsa05031	Amphetamine addiction	3/25	111/10797	0.02	JUN, ARC, FOS
E1	hsa05161	Hepatitis B	4/25	243/10797	0.02	JUN, MYC, FOS, NFKBIA
E1	hsa05210	Colorectal cancer	3/25	144/10797	0.03	JUN, MYC, FOS
E1	hsa05222	Small cell lung cancer	3/25	144/10797	0.03	PTGS2, MYC, NFKBIA
E1	hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	3/25	148/10797	0.03	JUN, FOS, NFKBIA
E1	hsa04625	C-type lectin receptor signaling pathway	3/25	152/10797	0.03	JUN, PTGS2, NFKBIA
E1	hsa04660	T cell receptor signaling pathway	3/25	156/10797	0.04	JUN, FOS, NFKBIA
E1	hsa05142	Chagas disease (American trypanosomiasis)	3/25	165/10797	0.04	JUN, FOS, NFKBIA
E1	hsa05169	Epstein-Barr virus infection	4/25	331/10797	0.04	JUN, HES1, MYC, NFKBIA
E1	hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	3/25	169/10797	0.04	VEGFC, EGR1, JUN
E1	hsa04658	Th1 and Th2 cell differentiation	3/25	170/10797	0.04	JUN, FOS, NFKBIA

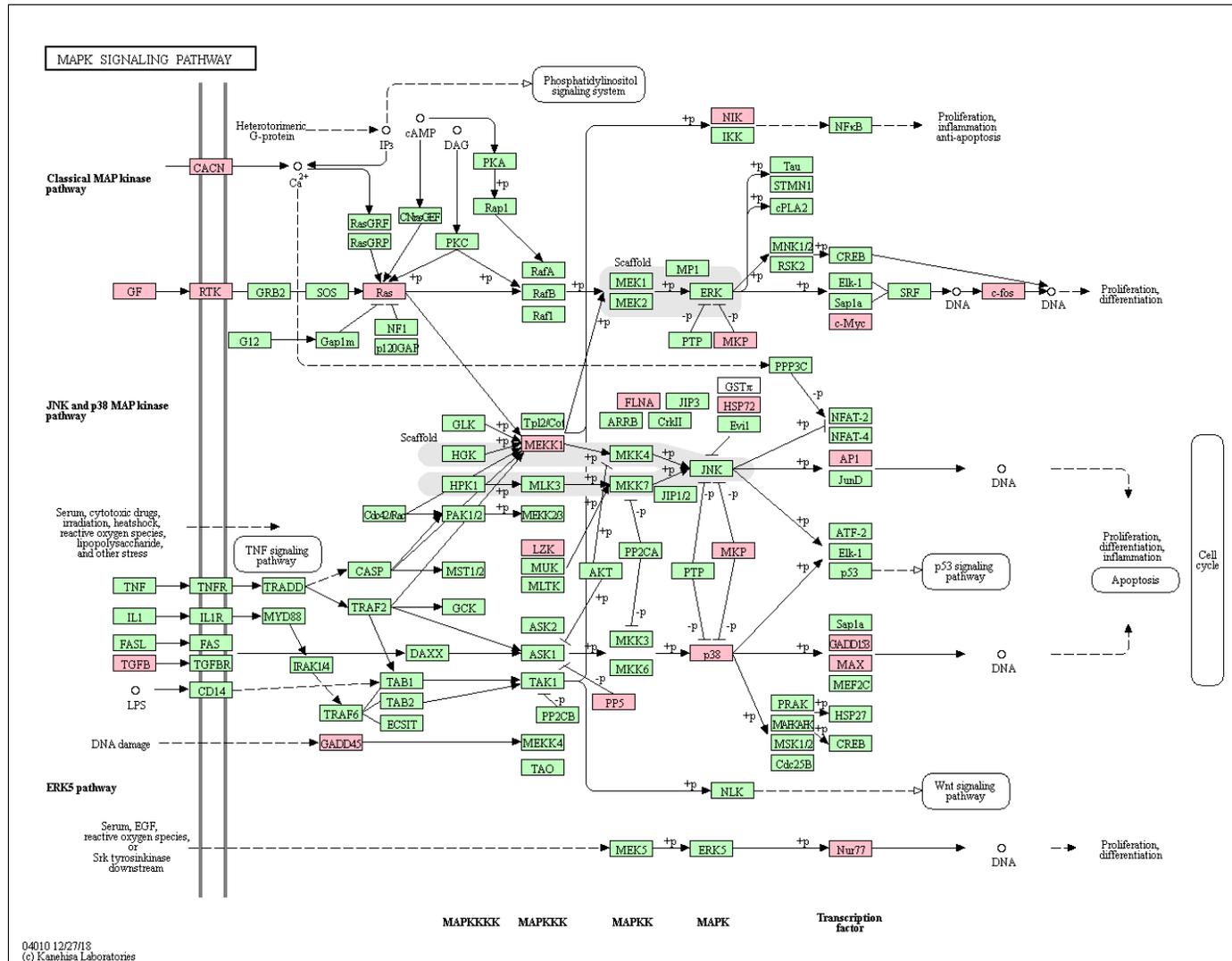
Módulo	ID Vía	Descripción	Razón-M	Razón-K	FDR	Genes
E2	hsa04115	p53 signaling pathway	4/29	102/10797	0.02	SERPINE1, GADD45G, CDKN1A, THBS1
E2	hsa04668	TNF signaling pathway	4/29	154/10797	0.04	LIF, BIRC2, IRF1, MAP3K14
E2	hsa04066	HIF-1 signaling pathway	4/29	167/10797	0.04	SERPINE1, CDKN1A, HK2, LTBR
I1	hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	13/94	398/10797	0.01	TNFRSF12A, IL11RA, LIF, CCL19, CCL13, CCL3L1, IL1R2, LEP, TNFRSF21, INHBA, TNFRSF11B, TNFRSF6B, IL21R
I1	hsa05205	Proteoglycans in cancer	11/94	319/10797	0.01	FLNA, MSN, KDR, ITGA2, ERBB3, HBEGF, ITGB1, FZD6, RRAS2, THBS1, MRAS
I1	hsa05412	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	6/94	105/10797	0.02	ITGA2, ITGB1, CDH2, JUP, ITGB6, CACNG5
I1	hsa04530	Tight junction	8/94	241/10797	0.05	MSN, CLDN5, RUNX1, MYH9, ITGB1, ACTN1, SLC9A3R1, TUBA1A
I3	hsa03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	12/70	93/10797	0.00	NOP56, GNL3, RIOK2, PWP2, RBM28, UTP4, BMS1, FBL, DKC1, UTP18, NOP58, TBL3
L1	hsa03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	8/97	93/10797	0.00	WDR3, RIOK2, GAR1, UTP15, UTP4, HEATR1, POP1, UTP6
L1	hsa00510	N-Glycan biosynthesis	5/97	67/10797	0.02	DOLPP1, MAN2A1, ALG6, ALG2, MGAT1
L1	hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	9/97	256/10797	0.02	HYOU1, DNAJC3, HSP90B1, CKAP4, EDEM1, PDIA6, DERL1, SEC24C, SEL1L
L2	hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	8/66	256/10797	0.01	TRAM1, SEC24B, UBE2G1, RPN1, UGGT1, STT3B, HSPA8, ERN1
L2	hsa04360	Axon guidance	8/66	269/10797	0.01	SRC, PIK3R2, SEMA3C, SEMA3B, FZD3, MYL12A, NTN1, PLXNB3
L2	hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	7/66	203/10797	0.01	SMAD1, PIK3R2, WNT7B, FZD3, CTNNB1, FZD2, RIF1
L2	hsa05205	Proteoglycans in cancer	8/66	319/10797	0.02	SRC, PIK3R2, PXN, WNT7B, FLNC, FZD3, CTNNB1, FZD2
L2	hsa00510	N-Glycan biosynthesis	4/66	67/10797	0.02	ALG8, ALG12, RPN1, STT3B
L2	hsa05100	Bacterial invasion of epithelial cells	5/66	122/10797	0.02	SRC, PIK3R2, PXN, CTNNB1, RHOG

Módulo	ID Vía	Descripción	Razón-M	Razón-K	FDR	Genes
L2	hsa05217	Basal cell carcinoma	4/66	89/10797	0.05	WNT7B, FZD3, CTNNB1, FZD2
L3	hsa03030	DNA replication	7/81	54/10797	0.00	MCM7, MCM5, MCM2, FEN1, MCM3, MCM4, MCM6
L3	hsa04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	12/81	256/10797	0.00	MOGS, UGGT2, CALR, PDIA3, HSP90B1, CAPN1, SEC13, SSR3, PDIA4, DERL1, STT3A, HSPBP1
L3	hsa04110	Cell cycle	9/81	194/10797	0.00	MCM7, ORC6, ORC1, MCM5, MCM2, MCM3, MCM4, E2F1, MCM6
L3	hsa03008	Ribosome biogenesis in eukaryotes	6/81	93/10797	0.00	WDR36, NOB1, SNU13, XPO1, REXO2, EIF6
L3	hsa00510	N-Glycan biosynthesis	5/81	67/10797	0.00	MOGS, ALG5, ALG6, ALG3, STT3A

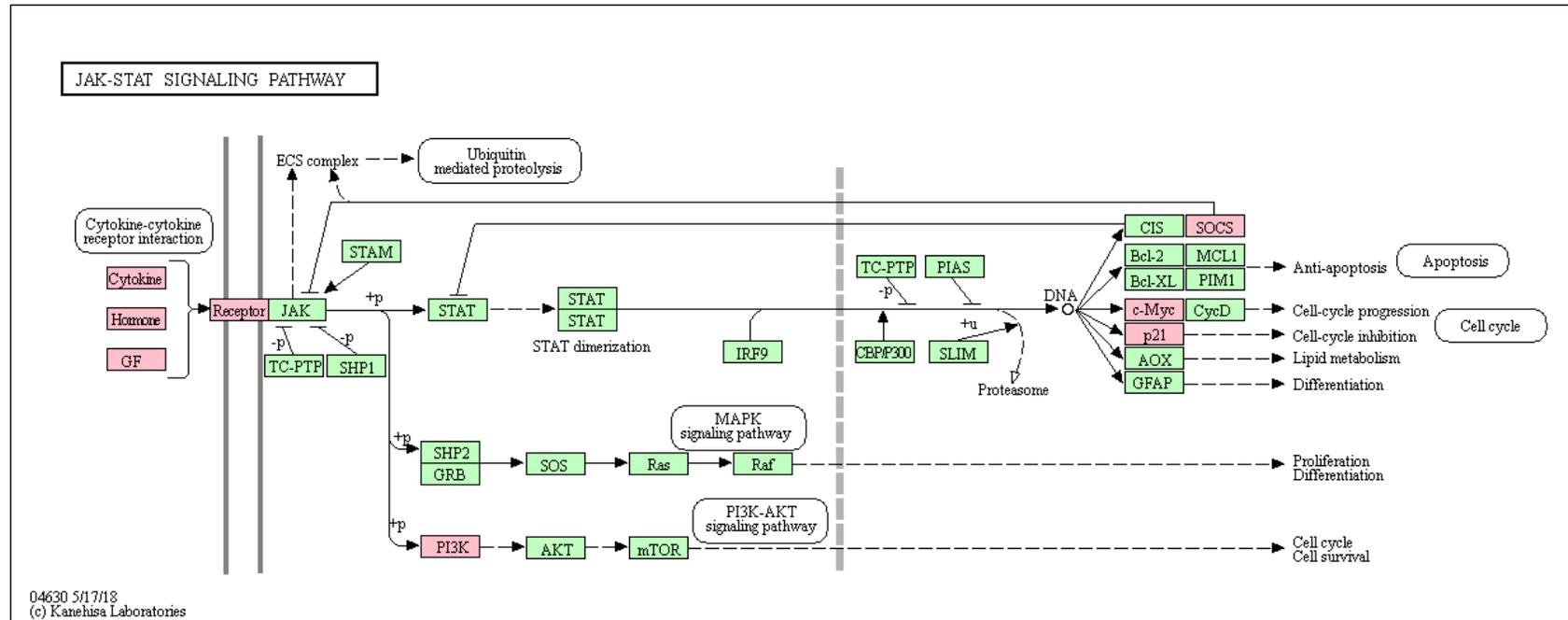
Apéndice 9. Vías de señalización KEGG con participantes diferencialmente expresados.



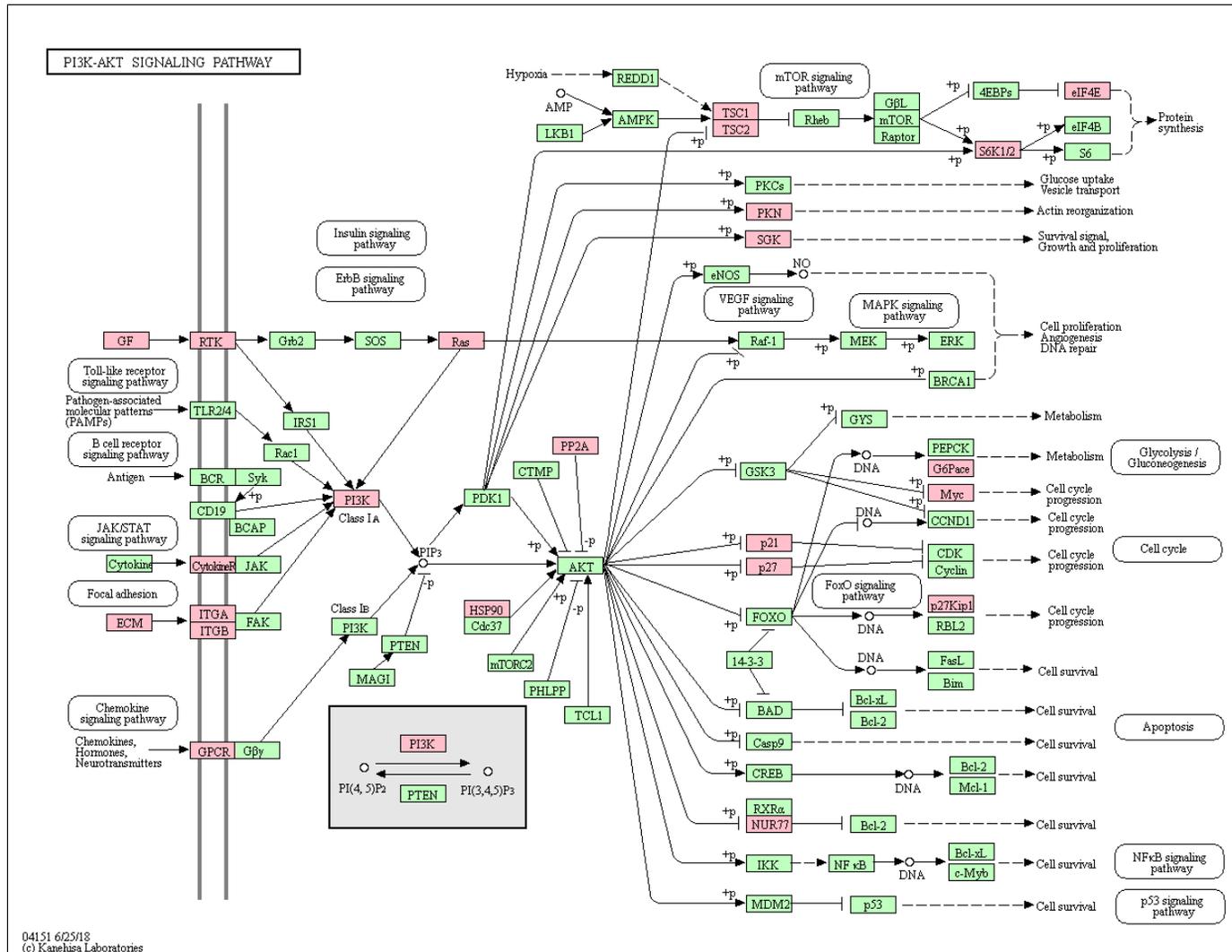
Esquema de la vía de señalización TNF. En color rosado son destacados todos los componentes de esta vía de señalización, los cuales fueron identificados como diferencialmente expresados en nuestros análisis. Imagen extraída de <http://www.genoma.jp/kegg>, correspondiente al modelo de vía de señalización humana donde fueron mapeados nuestros datos.



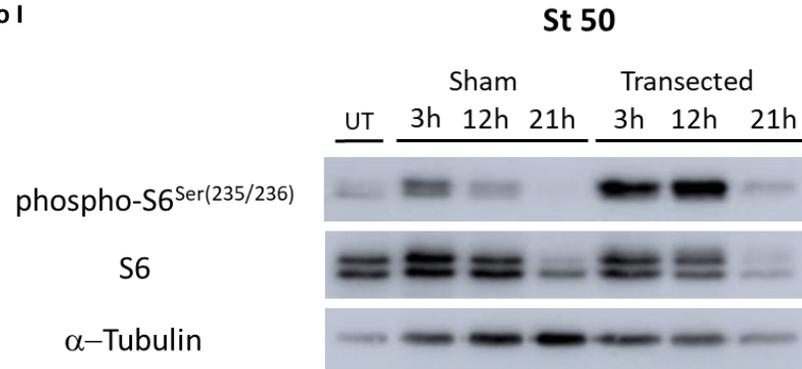
Esquema de la vía de señalización MAPK. En color rosado son destacados todos los componentes de esta vía de señalización, los cuales fueron identificados como diferencialmente expresados en nuestros análisis. Imagen extraída de <http://www.genoma.jp/kegg>, correspondiente al modelo de vía de señalización humana donde fueron mapeados nuestros datos.



Esquema de la vía de señalización JAK/STAT. En color rosado son destacados todos los componentes de esta vía de señalización, los cuales fueron identificados como diferencialmente expresados en nuestros análisis. Imagen extraída de <http://www.genoma.jp/kegg>, correspondiente al modelo de vía de señalización humana donde fueron mapeados nuestros datos.



Esquema de la vía de señalización PI3K/AKT. En color rosado son destacados todos los componentes de esta vía de señalización, los cuales fueron identificados como diferencialmente expresados en nuestros análisis. Imagen extraída de <http://www.genoma.jp/kegg>, correspondiente al modelo de vía de señalización humana donde fueron mapeados nuestros datos.

Apéndice 10. Evaluación de los niveles de p-S6 en respuesta a la transección en animales en estadio-R**Ensayo I****Ensayo II**