



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado

**Análisis de la dinámica transcripcional asociada al
desarrollo y regeneración del hueso craneal de *Xenopus
tropicalis***

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

Héctor Benjamín Castillo Córdova

Concepción-Chile

2024

Profesor Guía: Dr. Sylvain G. Marcellini Liotaud

Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Sylvain Marcellini L.
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Roxana Pincheira
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Felipe Aguilera
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Nelson Osses
Profesor Evaluador Externo
Universidad Católica de Valparaíso

Dr. Ariel Castro A.
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas,
Área Biología Celular y Molecular

AGRADECIMIENTOS

Ha sido un camino complejo, más largo de lo esperado. A pesar de que hubo un momento en el que creí que no lo iba a lograr, siempre aparecieron personas que me motivaron a seguir. En primer lugar, agradecerle a Héctor, mi papá, Roxana, mi mamá, y Rocío y Francisco, mis hermanos, por el cariño incondicional y por siempre tener un abrazo a pesar de mi apatía involuntaria. A mi tutor, Sylvain, a quien considero una persona con una gran calidad humana, ya que desde el primer día no solo se ha preocupado de apoyarme en términos académicos, sino que también en la vida fuera del laboratorio. A mis compañeros del LADE, tanto a la conformación antigua: Gastón, Pedro, Fret, Adrián y David, como a la nueva: Marco, Japhet, Lefney e Isidora, de quienes valoro mucho su disposición a generar un ambiente fraterno y cómodo para convivir y trabajar a gusto. También mencionar al miembro putativo del LADE, Ian, y a la gente del LAGA: Maryori, Felipe y Jaime. Adicionalmente, quería agradecerles a mis alumnos por ayudarme a reactivar la confianza en mí y a la profesora Susana, Barbara y Fidelina, por siempre confiar en mis capacidades en la docencia.

Cuando comencé el doctorado uno de mis grandes pilares fue mi antigua pareja, Danu, y aunque ya no estamos juntos, nunca olvidaré todo el amor y el respaldo que me brindó en esa época. Lo mismo con su familia, Leonidas y Teresa y Maite, que me acogieron como uno de los suyos.

A mis amigos de Acción Sin Límites lucha libre, especialmente a las personas que lo conforman este año, su humor y preocupación me alegran los días aun en medio del estrés. A Claudia y Daniela por acompañarme y quererme, a Juanito y Claudio por estar desde siempre, y a Ramón por su eterna preocupación. Finalmente agradecer a mis amigos de cuatro patas, a Thor y a Nori, a ambos los conocí en circunstancias y tiempos distintos, pero los dos me cambiaron la vida, haciéndome entender mejor mi entorno y a mí mismo.

Tesis de Doctorado Financiado por:

Beca ANID para estudios de Doctorado Nacional (2018-2021)

Gastos Operacionales ANID folio 21181362 (2020)

Beca Universidad de Concepción para postgrado (2022)

Proyecto FONDECYT REGULAR #1190926

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE ANEXOS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	3
1.1.1. Promotor	3
1.1.2. Elementos <i>cis</i> -regulatorios distales	4
1.1.2.1. Enhancers	4
1.1.2.2. Silenciadores	5
1.1.2.3. Insuladores	5
1.1.3. Los enhancers obedecen a una lógica regulatoria	7
1.1.4. Mutaciones en enhancers pueden causar patologías en humanos	7
1.1.5. Evolución de los enhancers	8
1.1.6. Técnicas de secuenciación masiva para el estudio de la regulación transcripcional	8
1.2. MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE LA REGENERACIÓN TISULAR EN VERTEBRADOS	11
1.2.1. Bases celulares de la regeneración tisular	11
1.2.2. Microambiente inmune asociado a la regeneración tisular	11
1.2.3. Enhancers específicos modulan la regeneración tisular	12
1.3. DESARROLLO, EVOLUCIÓN Y REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO	15
1.3.1. Aspectos celulares y moleculares de la esquelotogénesis	15
1.3.2. Regulación transcripcional de genes óseos	16
1.3.3. Origen evolutivo del esqueleto y su capacidad regenerativa	17
1.3.4. Regeneración ósea	17
1.3.4.1. Regeneración ósea endocondral	17
1.3.4.2. Regeneración ósea intramembranosa	18
1.4. <i>XENOPUS TROPICALIS</i> COMO MODELO PARA ESTUDIOS DE DESARROLLO Y REGENERACIÓN ÓSEA	20
1.4.1. Generalidades del modelo	20
1.4.2. Formación de hueso frontoparietal de <i>Xenopus tropicalis</i>	21
1.4.3. Estudios de regulación transcripcional en <i>Xenopus tropicalis</i>	22
1.5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS Y LESIÓN CRANEAL	24
2.2. PREPARACIÓN LIBRERÍAS DE ATAC-SEQ	24
2.2.1. Disgregación de tejidos	24
2.2.2. Reacción de transposición	24
2.2.3. Amplificación y secuenciación de las librerías ATAC-seq	25
2.2.4. Electroforesis en geles de agarosa	26
2.3. DESCARGA DE CONJUNTOS DE DATOS DE ATAC-SEQ DE MUESTRAS HUMANAS	26

2.4.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE ATAC-SEQ	27
2.4.1.	Procesamiento de los datos de ATAC-Seq.....	27
2.4.2.	RLN y disposición de mononucleosomas	28
2.4.3.	Clusterización picos ATAC-Seq	28
2.4.4.	Anotaciones, Enriquecimiento de TFBS y Ontología Génica.....	28
2.4.5.	Análisis de conservación	29
2.5.	ANÁLISIS RNA-SEQ	30
2.5.1.	Extracción ARN total	30
2.5.2.	Procesamiento de los datos de RNA-Seq.....	30
2.5.3.	Clusterización datos RNA-Seq	31
2.5.3.	Integración datos ATAC-seq y RNA-seq.....	31
2.6.	ANÁLISIS CHIP-SEQ	31
2.7.	GRÁFICOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
2.8.	HISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA	32
2.8.1.	Tinción Alizarin Red y Calceín Green	32
2.8.2.	Inmunofluorescencia de montaje completo.....	32
2.9.	HISTOLOGÍA DE HUESO EN PROCESO DE REGENERACIÓN	33
2.9.1.	Cortes histológicos en criostato	33
2.9.2.	Tinción Hematoxilina-Eosina	33
2.10.	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN POR PCR	33
2.10.1.	Generación de ADNc mediante RT-PCR.....	33
2.10.2.	Amplificación de ADNc mediante PCR de alta fidelidad.....	34
2.11.	CLONACIÓN MOLECULAR	34
2.11.1.	Clonación mediante ligación	34
2.11.2.	Transformación bacteriana por golpe térmico.....	34
2.11.3.	Selección de colonias y PCR colonia.....	34
2.11.4.	Purificación de plásmidos.....	35
2.11.5.	Digestiones analíticas mediante enzimas de restricción.....	35
2.12.	REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN CON UTP-DIG	35
2.12.1.	Linearización de Plásmidos.....	35
2.12.2.	Reacción de Transcripción y Purificación de Sondas ARN-Dig Mediante Precipitación con LiCl ₂	36
2.13.	HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	36
2.13.1.	Inclusión en parafina de calvarias en proceso de regeneración de <i>Xenopus tropicalis</i> 36	
2.13.2.	HIS en cortes de calvarias en proceso de regeneración de <i>Xenopus tropicalis</i>	36
2.14.	WESTERN BLOT	37
2.14.1.	Extracción de proteínas totales	37
2.14.2.	Western blot de muestras óseas de <i>Xenopus tropicalis</i>	38
3.	RESULTADOS.....	39
3.1.	CARACTERIZACIÓN DEL PAISAJE REGULATORIO DE OSTEÓBLASTOS DURANTE EL DESARROLLO.....	39
3.1.1.	Identificación de regiones de cromatina abierta de osteoblastos, hígado, corazón y pulmón 39	
3.1.2.	Clasificación de regiones libres de nucleosomas tejido-específicas y ubicuas.	42
3.1.3.	Características de secuencia de las regiones de cromatina abierta tejido-específicas y ubicuas en <i>Xenopus tropicalis</i>	45

3.1.4.	Las regiones de cromatina abierta específicas de osteoblastos están asociadas con genes transcritos y presentan marcas de histonas de promotores y enhancers activos	47
3.1.5.	Grado de conservación de las regiones de cromatina abierta tejido-específicas y ubicuas de <i>X. tropicalis</i>	51
3.1.6.	Validación cruzada de secuencias conservadas que exhiben una RLN específica de osteoblastos tanto en rana como en humano.	54
3.2.	CARACTERIZACIÓN DEL PAISAJE REGULATORIO DEL HUESO DURANTE PROCESOS REGENERATIVOS	59
3.2.1.	Estandarización de la regeneración intramembranosa de <i>Xenopus tropicalis</i>	60
3.2.2.	Clusterización de genes diferenciales expresados en el desarrollo y la regeneración de calvaria de <i>Xenopus tropicalis</i>	62
3.2.3.	Clusterización de elementos <i>cis</i> -regulatorios implicados en el desarrollo y la regeneración de calvaria de <i>Xenopus tropicalis</i>	64
3.2.4.	Sitios de unión a factores de transcripción enriquecidos en los clústeres de desarrollo y regeneración ósea de <i>Xenopus tropicalis</i>	67
3.2.5.	Grado de conservación de secuencia con humano de las regiones de cromatina abierta asociadas a desarrollo y regeneración ósea de <i>Xenopus tropicalis</i>	68
3.2.6.	Integración de los datos obtenidos por RNA-seq y ATAC-seq: Identificación de enhancers putativos de regeneración y desarrollo del hueso de <i>Xenopus tropicalis</i>	69
3.2.7.	Participación de <i>dlx5</i> y <i>sox2</i> en el desarrollo y la regeneración ósea	73
3.2.7.1.	<i>dlx5</i>	73
3.2.7.2.	<i>sox2</i>	75
4.	DISCUSIÓN.....	78
4.1	SOBRE LA NATURALEZA DE LAS MUESTRAS.....	78
4.2	LA ARQUITECTURA DE LAS RLN UBICUAS DIFIERE DE LAS TEJIDO-ESPECÍFICAS	79
4.3	LAS MARCAS DE HISTONAS VALIDAN ENHANCERS Y SILENCIADORES OSTEABLÁSTICOS.....	79
4.4.	CONSERVACIÓN GLOBAL DE REGIONES REGULATORIAS.....	80
4.5.	UNA LÓGICA REGULATORIA BIEN CONSERVADA PARA LOS ENHANCERS DE OSTEOLASTOS EN DESARROLLO.....	81
4.6.	IDENTIFICACIÓN DE ENHANCERS Y PROMOTORES OSTEOGÉNICOS RELEVANTES PARA LA BIOLOGÍA HUMANA	82
4.7.	ACLARACIONES DEL MODELO DE LESIÓN CRANEAL	82
4.8.	LA UTILIDAD DE LA CLUSTERIZACIÓN E INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS ATAC-SEQ Y RNA-SEQ	83
4.9.	VARIACIÓN ENTRE LA LÓGICA REGULATORIA DEL DESARROLLO Y LA REGENERACIÓN ÓSEA.....	83
4.10.	ELEMENTOS REGULADORES EN - <i>CIS</i> DE LA REGENERACIÓN Y EL DESARROLLO DE HUESO	85
4.11.	IDENTIDAD DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS RESIDENTES EN EL TEJIDO EN REGENERACIÓN TEMPRANA.....	86
5.	CONCLUSIONES.....	89
6.	PERSPECTIVAS.....	89
6.1.	VALIDACIÓN DE ELEMENTOS REGULADORES EN - <i>CIS</i> DEL DESARROLLO ESQUELÉTICO	89
6.2.	IDENTIDAD DE LAS CÉLULAS DEL TEJIDO EN REGENERACIÓN TEMPRANA	90

6.3.	COMPROBAR LA DEDIFERENCIACIÓN DE OSTEÓBLASTOS	90
6.4.	EVALUAR LOS ENHANCERS PUTATIVOS DE LA REGENERACIÓN ÓSEA	90
7.	ANEXOS	91
8.	REFERENCIAS.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Actividad de los elementos cis-regulatorios distales en la transcripción. Actividad de los elementos cis-regulatorios distales en la transcripción	6
Figura 2.	Técnicas de secuenciación masiva para la identificación de elementos cis-regulatorios.....	10
Figura 3.	Enhancers específicos se activan en respuesta a lesiones.....	14
Figura 4.	Mecanismos de desarrollo óseo.....	16
Figura 5.	Osteogénesis de la calvaria de <i>Xenopus tropicalis</i>	21
Figura 6.	Obtención de muestras y construcción de librerías	27
Figura 7.	Flujo de trabajo bioinformático utilizado para el análisis de los datos de ATAC-seq y RNA-seq	29
Figura 8.	Comprobación de la ausencia de mineral en los tejidos control	39
Figura 9.	Validación de las librerías de ATAC-Seq.....	40
Figura 10.	Caracterización de los picos de ATAC-Seq	41
Figura 11.	Identificación de regiones de cromatina abierta tejido-específicas	43
Figura 12.	Comparación de las señales de ATAC-Seq.....	44
Figura 13.	Características de las secuencias de los picos SIT y no-SIT.....	45
Figura 14.	Enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción	47
Figura 15.	La expresión génica y las marcas de histonas confirman la identificación de promotores y enhancers osteogénicos activos.....	48
Figura 16.	Categorización de las regiones de cromatina abierta SIT osteoblasto-específicas mediante ChIP-seq.....	50
Figura 17.	Categorización de las regiones de cromatina abierta no-SIT osteoblasto-específicas mediante ChIP-seq.....	51
Figura 18.	Conservación de secuencias de cromatina abierta en <i>Xt</i> entre siete especies de cordados	53
Figura 19.	Resumen de los principales hallazgos y validación cruzada de los enhancers, silenciadores y promotores específicos de osteoblastos con relevancia médica y evolutiva	57
Figura 20.	Superposición significativa entre RLN osteoblásticas conservadas de <i>Xt</i> y <i>Hs</i>	58
Figura 21.	Validación de las librerías de ATAC-Seq humanas	59
Figura 22.	Análisis GREAT sobre las regiones filtradas mediante validación cruzada.....	59
Figura 23.	Características celulares y tisulares de la regeneración ósea de <i>Xenopus tropicalis</i>	62
Figura 24.	Clusterización de perfiles de expresión de transcritos	63

Figura 25. Validación y clusterización de regiones de cromatina abierta asociadas al desarrollo y a la regeneración craneal de <i>Xenopus tropicalis</i>	66
Figura 26. Proporción de regiones de cromatina abierta osteoblásticas identificadas en el desarrollo que también se encuentran presentes en el mesénquima osteogénico y en el tejido óseo regenerativo en fase temprana y tardía.....	67
Figura 27. Enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción y su expresión en desarrollo y regeneración ósea.....	68
Figura 28. Conservación de secuencias de cromatina abierta osteogénicas de <i>Xt</i> con humano.....	69
Figura 29. Integración de los resultados de RNA-Seq y ATAC-Seq.....	71
Figura 30. Perfiles de cromatina abierta y expresión de genes seleccionados mediante la integración de los resultados de ATAC-seq y RNA-seq.....	73
Figura 31. Expresión, regulación y conservación de <i>dlx5</i> en tejido esquelético.....	74
Figura 32. Regulación transcripcional de <i>sox2</i> y proliferación celular de la zona de regeneración.....	76
Figura 33. Modelo celular y molecular propuesto para el desarrollo y regeneración ósea intramembranosa en <i>Xenopus tropicalis</i>	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la regeneración de estructuras óseas y sus mecanismos entre mamíferos, peces y anfibios.....	20
Tabla 2. Secuencias de los partidores utilizados para la amplificación de librerías ATAC-seq.	25
Tabla 3. La tabla presenta el número de coincidencias obtenidas para cada uno de los genomas de cordados analizados (<i>X.l.</i> , <i>Xenopus laevis</i> ; <i>G.g.</i> , <i>Gallus gallus</i> ; <i>H.s.</i> , <i>Homo sapiens</i> ; <i>D.r.</i> , <i>Danio rerio</i> ; <i>C.m.</i> , <i>Callorhinchus milii</i> ; <i>P.m.</i> , <i>Petromyzon marinus</i> ; <i>B.f.</i> , <i>Branchiostoma floridae</i>).	54
Tabla 4. Combinación de transcritos y RLN contenidos en los Clústeres de RNA-seq y ATAC-seq, respectivamente.....	64

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Distribución del tamaño de fragmentos en escalas lineal y logarítmica de los tejidos control.....	91
Anexo 2. Frecuencia de sitios de unión de factores de transcripción (TFBS).....	92
Anexo 3. Tabla con las coordenadas genómicas de las RLN osteoblasto-específicas identificadas en <i>Xenopus tropicalis</i> y conservadas con el genoma humano.....	96
Anexo 4. Calidad del ARN extraído.....	97
Anexo 5. Comparación del enriquecimiento de TFBS entre regiones distales osteoblasto-específicas conservadas y no conservadas.....	97
Anexo 6. Tabla que muestra la superposición entre los RLN osteoblasto-específicos conservados con humano, los SNPs de GWAS y sus rasgos relacionados con hueso.....	98
Anexo 7. Resumen de los análisis GWAS.....	99
Anexo 8. Perfiles de cromatina abierta en el locus de <i>spi1</i>	99

ABREVIATURAS

AP-1: Activator Protein 1.

ATAC-seq: Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing.

ATP6v0d2: ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2

ChIP-seq: Chromatin Immunoprecipitation Sequencing.

DEPC: Diethyl pyrocarbonate.

Dlx5: Distal-less homeobox 5.

Dpl: Días post lesión.

ERT: Enhancers de regeneración tisular.

GeTMM: Gene corrected of Trimmed Mean of M-value.

GO: Gene Ontology.

GWAS: Genome-wide association study

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution.

HIS: Hibridación *in situ*

Mmp13: Matrix metallopeptidase 13.

NF: Nieuwkoop and Faber.

NFI: Nuclear Factor I

Nog: Noggin

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PCA: Principal Component Analysis.

PCR: Polymerase Chain Reaction

PFA: Paraformaldehído.

PH3: Phospho-Histone H3

REST: RE1-Silencing Transcription factor

RLN: Región libre de nucleosomas.

Runx2: Runt-related transcription factor 2

SIT: Sitio de Inicio de la Transcripción.

Sox2: SRY (sex determining region Y)-box 2.

TEAD: TEA domain family member

TFBS: Transcription Factor Binding Site.

TMM: Trimmed Mean of M-value.

RESUMEN

Hasta la fecha, se desconoce si el programa de regulación génica involucrado en el desarrollo del hueso craneal de los anfibios se reactiva durante la regeneración ósea. Tras una lesión craneal, los renacuajos de *Xenopus tropicalis* reparan el daño formando un tejido mesenquimatoso no mineralizado a los 5 días post-lesión (5dpl), y posteriormente lo cubren con una capa delgada de hueso (15dpl). Para explorar la relación entre los mecanismos transcripcionales de la osificación craneal durante el desarrollo y la regeneración, realizamos experimentos duplicados de RNA-Seq y ATAC-Seq utilizando tres tipos de muestras: **i)** región regenerativa temprana (5dpl) y tardía (15dpl), **ii)** precursores osteogénicos no diferenciados (del mesénquima de larvas NF50) y osteoblastos diferenciados (de cráneos de larvas NF58), y **iii)** hígado, corazón y pulmón como controles no mineralizados. Determinamos que los osteoblastos en desarrollo poseen una lógica regulatoria bien conservada con los mamíferos, identificando 35 enhancers conservados que, en humano, contienen SNPs, asociados a fenotipos esqueléticos. Los análisis PCA del perfil transcriptómico y del paisaje de cromatina abierta revelan que la regeneración temprana es más similar a los osteoblastos que al mesénquima. Diseñamos un método novedoso para integrar datos de ATAC-seq y RNA-seq, definiendo siete clústeres que permitieron identificar genes sobreexpresados y sus regiones regulatorias específicas. Basados en ontología génica y enriquecimiento de TFBS, determinamos que la red transcripcional de la regeneración temprana está relacionada con la remodelación de la matriz (*mmp13*), el sistema inmune (*spi1*) y los precursores osteogénicos (*sox2*). Sin embargo, carece de los marcadores de patrón embrionario presentes en el mesénquima (*nog*). En los osteoblastos recién diferenciados de la regeneración tardía, *dlx5* cumple un rol clave en la regulación, mientras que el programa genético de los osteoblastos maduros del desarrollo requiere del heterodímero Jun/Fos. En resumen, identificamos un conjunto de enhancers putativos y sus genes diana que se activan en pasos precisos durante el desarrollo y la regeneración del hueso craneal. Nuestros resultados sugieren que los osteoblastos se desdiferencian en un estado celular intermedio mediante la reactivación de genes de pluripotencia como *sox2*. Este estudio proporciona datos relevantes para entender los mecanismos moleculares que permiten al hueso de los anfibios formarse y regenerarse eficientemente tras un daño crítico.

ABSTRACT

It is currently unknown whether the gene regulatory program involved in the development of amphibian cranial bone is reactivated during the regeneration process. After cranial injury, *Xenopus tropicalis* tadpoles repair the damage by forming unmineralized mesenchymal tissue at 5 days post-injury (5dpi), and subsequently covering it with a thin layer of bone at 15 days post-injury (15dpi). To explore the relationship between the transcriptional mechanisms underlying cranial ossification during development and regeneration, we conducted duplicate RNA-Seq and ATAC-Seq experiments using three sample types: **i)** early (5dpi) and late (15dpi) regenerating regions, **ii)** undifferentiated osteogenic precursors (from NF50 larval mesenchyme) and differentiated osteoblasts (from NF58 larval skulls), and **iii)** liver, heart, and lung as non-mineralized controls. We determined that developing osteoblasts have a regulatory logic well-conserved with mammals, identifying 35 conserved enhancers that are associated to SNPs causing human skeletal phenotypes. PCA analyses of the transcriptomic profiles and open chromatin landscapes reveal that early regeneration is more similar to osteoblasts than to mesenchyme. We designed a novel method to integrate ATAC-seq and RNA-seq data, defining seven clusters that allowed the identification of overexpressed genes and specific regulatory regions. Based on gene ontology and TFBS enrichment, we determined that the transcriptional network of early regeneration is related to matrix remodeling (*mmp13*), immune system (*spi1*), and osteogenic precursors (*sox2*). However, it lacks embryonic patterning markers present in mesenchyme (*nog*). In newly differentiated osteoblasts of late regeneration (15dpi), Dlx5 plays a key regulatory role, while the genetic program of mature osteoblasts in development requires the Jun/Fos heterodimer. In summary, we identified a set of putative enhancers and their target genes that are activated at precise steps during cranial bone development and regeneration. Our results suggest that osteoblasts dedifferentiate into an intermediate cellular state of the osteoblastic lineage through the reactivation of pluripotency genes such as *sox2*. This study provides relevant data to understand the molecular mechanisms that enable amphibian bone to form and regenerate efficiently after critical size damage.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Regulación transcripcional

Tanto en el desarrollo como en los procesos regenerativos, grupos de células activan la expresión de genes específicos de manera concertada, dando lugar a la formación, definición funcional y reparación de los tejidos del organismo. Esta sincronización génica se encuentra, en parte, determinada por la regulación transcripcional, la cual exige la meticulosa disposición de un complejo entramado de interacciones entre proteínas (elementos *trans*-) y segmentos no codificantes de ADN (elementos *cis*-) [1], [2]. Dentro de los elementos *trans*- se encuentran los factores de transcripción con función activadora o represora, efectores de vías de señalización, complejos modificadores de cromatina, proteínas arquitecturales y el complejo de iniciación de la transcripción, entre otros [3], [4], [5]. Dentro de los elementos *cis*- se destaca la presencia de **(i)** los promotores basales, encargados de reclutar la ARN polimerasa II [6], y **(ii)** los enhancers, que son secuencias de ADN capaces de modular el patrón de expresión espacio-temporal de genes específicos [7], [8]. Aunque la participación de los enhancers durante el control transcripcional ha sido mayormente explorada en el contexto del desarrollo embrionario, enfermedades y evolución [9], trabajos recientes se han enfocado en comprender su función en respuesta a un daño tisular, dando lugar a la formulación de una interesante pregunta: **¿El proceso regenerativo de un tejido determinado implica la activación de enhancers diferentes a los involucrados en su desarrollo?** Y si ese fuera el caso, **¿cuáles serían los mecanismos celulares controlados por estos enhancers propios de la regeneración?** Antes de abordar las distintas aristas de estos cuestionamientos, presentaremos acá los distintos elementos involucrados en el control de la expresión génica.

1.1.1. Promotor

La transcripción comienza típicamente en una posición específica conocida como el sitio de inicio de la transcripción (SIT), ubicado en el extremo 5' de un gen. **El SIT se encuentra dentro de una región denominada promotor basal**, secuencia corta de aproximadamente 100 pb que sirve como plataforma de unión para la maquinaria de transcripción, incluyendo la ARN polimerasa II y sus factores de transcripción generales asociados [10], [11]. En los promotores basales se han identificado elementos de ADN conservados desde levaduras hasta mamíferos y que permiten la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción. Dentro de los motivos más estudiados se pueden encontrar la caja TATA, el iniciador (Inr), los elementos de reconocimiento de TFIIB (BREs) y el elemento promotor corriente abajo (DPE) [12], [13]. Estos motivos no se encuentran en todos los promotores; de hecho, muchos carecen por completo de alguno de estos elementos [14]. Adicionalmente, en los vertebrados, los promotores a menudo presentan características distintivas en la secuencia de ADN, tales como el enriquecimiento en sitios de unión a factores de transcripción (Transcription Factor Binding Sites o TFBS), la presencia de islas CpG (CGI), un alto contenido de

dinucleótidos GC y la ausencia de la metilación del ADN (5-metilcitosina, 5mC) [15], [16]. En promotores CGI, no metilados y de genes altamente expresados, se genera un fenómeno denominado GC-skewing ("sesgo-GC"), que se define como una distribución no homogénea de guaninas y citosinas a lo largo de la hebra sentido, con una mayor proporción de citosinas antes del SIT, y una mayor proporción de guaninas corriente abajo del SIT. La función biológica del sesgo-GC se relaciona con la predisposición de la secuencia a formar R-loops entre ADN y ARN durante la transcripción y así evitar la metilación del promotor [17], [18]. Considerando que los factores *trans*-reguladores deben tener acceso al ADN, la arquitectura de la cromatina promotora se distingue por contar con una **región libre de nucleosomas (RLN)**, la cual está flanqueada por nucleosomas que ocupan posiciones precisas en el genoma. En los promotores activos, los mononucleosomas adyacentes generalmente presentan la adición de la trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) [19], además de la acetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27ac) relacionada con procesos de activación transcripcional [20].

Si bien el promotor basal recluta la maquinaria y define con precisión el inicio y la dirección de la transcripción, su capacidad para respaldarla por sí sola es limitada. En cambio, para lograr una actividad eficiente y específica para cada tipo celular, suele integrar señales provenientes de diversos elementos *cis*-regulatorios ubicados más distalmente [21].

1.1.2. Elementos *cis*-regulatorios distales

Los elementos *cis*-regulatorios pueden ubicarse desde 500 pb a Mb de distancia del promotor del gen que regulan [22]. Estos pueden clasificarse según su influencia en la transcripción en tres categorías principales: **i)** enhancers, **ii)** silenciadores e **iii)** insuladores (Figura 1) [23].

1.1.2.1. Enhancers

Los enhancers activos potencian la transcripción y se distinguen por comprender una secuencia de ADN de aproximadamente 500 a 1000 pb, flanqueada por dos nucleosomas cuya histona H3 exhibe marcas específicas, como la mono-metilación de la lisina 4 (H3K4me1) y la acetilación de la lisina 27 (H3K27ac) [24]. Debido a la presencia de los dos nucleosomas flanqueantes, se ha propuesto que la RLN formada adopta una configuración similar a un "valle", creando un entorno propicio para la unión de factores de transcripción y efectores de las vías de señalización (Figura 1A) [25]. Esta clase de elementos reguladores pueden ejercer sus funciones independientemente de la orientación, posición y segregación espacial respecto a los genes objetivo [26]. Aunque los enhancers se pueden encontrar en regiones intergénicas, muchos de ellos están ubicados dentro de los cuerpos de los genes, principalmente en intrones. Dadas estas distancias, los modelos actuales de actividad predicen que un gran número de los enhancers apuntan al gen activo más cercano [27], [28]. Un estudio en larvas de *Drosophila* estimó que aproximadamente el 80% de los enhancers estimulan a sus genes vecinos inmediatos [29]. No obstante, al mismo tiempo existen varios ejemplos

destacados de enhancers en mamíferos que no actúan sobre los genes más próximos, como es el caso del elemento ZRS, que controla el gen *sonic hedgehog (shh)* a más de 850 kb de distancia [30], [31].

1.1.2.2. Silenciadores

Los silenciadores reducen los niveles de transcripción, y se caracterizan por ser secuencias enriquecidas en motivos de unión a factores de transcripción con actividad represiva, como es el caso de REST, una proteína que se ha identificado como un represor de genes neuronales en células no neuronales [32], [33], [34]. Por otro lado, los silenciadores han sido vinculados al Complejo Polycomb PRC2, encargado de catalizar la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) (Figura 1B) [35], [36]. Se ha reportado que algunos silenciadores emergieron durante la evolución para regular genes parálogos, lo que resulta en una expresión divergente, como es el caso de *pax8* y *pax2* en embrión de *Xenopus* [37].

1.1.2.3. Insuladores

Los insuladores cumplen una función crucial como barreras protectoras al prevenir la activación de promotores por enhancers no relacionados. Estas secuencias se destacan por su riqueza en sitios de unión a la proteína conservada CTCF, la cual desempeña un papel central en la organización de la cromatina al ayudar a establecer los límites de los Dominios Asociados Topológicamente (TADs), que son regiones del genoma que exhiben una alta frecuencia de interacciones físicas entre elementos genómicos dentro de esa región (Figura 1C) [38], [39], [40], [41]. Se ha demostrado que mutaciones en CTCF pueden perturbar la topología cromosómica, permitiendo interacciones regulatorias anómalas que inducen la expresión descontrolada de oncogenes en humanos [42].

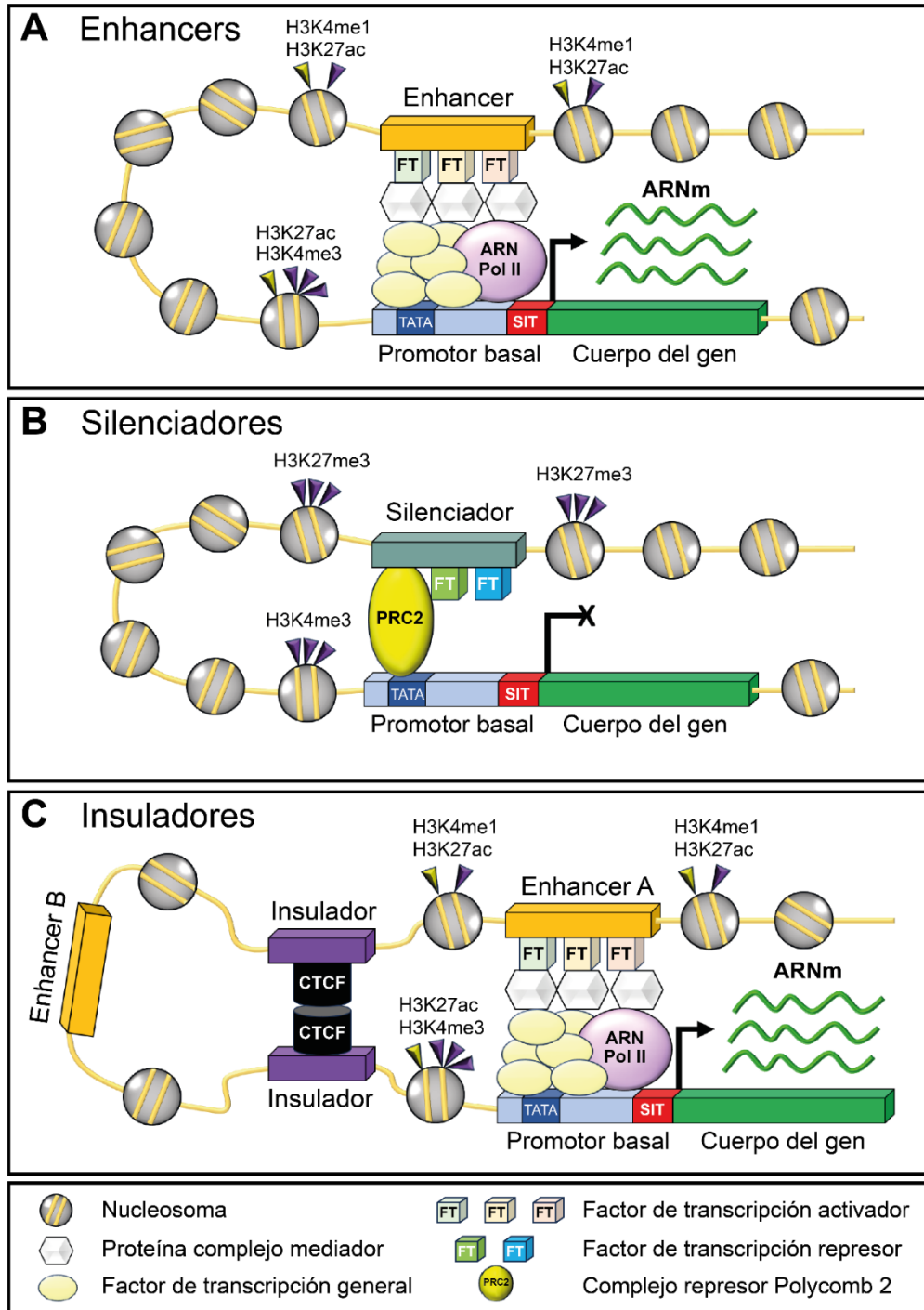


Figura 1. Actividad de los elementos *cis*-regulatorios distales en la transcripción. Actividad de los elementos *cis*-regulatorios distales en la transcripción. **(A)** Los enhancers representan regiones de cromatina abierta flanqueadas por nucleosomas con las marcas epigenéticas distintivas H3K427ac y H3K4me1. Estas secuencias contienen combinaciones específicas de sitios de unión a diversos factores que potencian la transcripción de un gen particular. **(B)** Los silenciadores son regiones de cromatina abierta que exhiben un enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción

represivos y correpresores, como PRC2. Su función principal radica en disminuir los niveles de transcripción al prevenir la unión de factores de transcripción generales al promotor del gen. **(C)** Los insuladores se distinguen por reclutar a CTCF y establecer barreras topológicas que impiden la activación no deseada de un gen por parte de enhancers incorrectos.

1.1.3. Los enhancers obedecen a una lógica regulatoria

El desarrollo adecuado de los tejidos implica la compleja activación de enhancers en momentos y lugares específicos. Un ejemplo de esto es un enhancer localizado en el intrón 2 de *Tbx5* que puede restringir la expresión temprana de este gen al brote mesenquimático de las extremidades anteriores en ratones. La secuencia del enhancer incluye sitios de unión para las proteínas Hox. De esta manera, las señales activadoras de Hox4 y Hox5, asociados a la región anterior, junto con las señales represoras de Hoxc8, Hoxc9 y Hoxc10, relacionados con la región posterior, colaboran para regular con precisión el patrón espacio-temporal de *Tbx5* [43]. Por otro lado, en ascidia se ha reportado un enhancer que controla el gen *Mesp* solo en el desarrollo de corazón [44] y un enhancer neural encargado de regular la expresión de *Otx* [45], [46]. Otro caso bien documentado es el del gen *Even-skipped (eve)*, el cual se expresa en el embrión de *Drosophila* en siete franjas alternas. A pesar de que el promotor de *eve* no puede generar este patrón por sí mismo, la región circundante de aproximadamente 12 kb contiene cinco enhancers, cada uno de los cuales activa la expresión de este gen en 1 o 2 franjas bien definidas, permitiendo una correcta segmentación embrionaria [47]. Considerando los ejemplos mencionados, se resalta que, desde la perspectiva de la lógica regulatoria, la compleja combinación de sitios de unión a distintos factores de transcripción localizados en los enhancers aumenta la sensibilidad del sistema a diversas señales ambientales o internas, permitiendo una respuesta ajustada a las condiciones cambiantes del entorno celular [45], [48].

1.1.4. Mutaciones en enhancers pueden causar patologías en humanos

Se ha observado que alteraciones en la actividad de los enhancers resultan en anomalías en el desarrollo. A diferencia de las mutaciones en regiones codificantes, que afectan la función genética en todos los tipos celulares que expresan ese gen, las mutaciones en las secuencias reguladoras suelen tener un impacto más específico en la etapa de desarrollo y el tipo celular, lo que conduce a consecuencias fenotípicas limitadas a tejidos particulares [49]. En mamíferos, mutaciones puntuales en el enhancer ZRS, responsable de la regulación del gen *shh*, pueden provocar malformaciones en las extremidades, como la polidactilia [50]. Mediante edición por Crispr/Cas9 del enhancer CNS1 en *Xenopus tropicalis*, se disminuyó la expresión en riñón de *Hnfb1*, gen cuya alteración está asociada con trastornos como quistes renales y diabetes [51].

En la actualidad, existe un gran número de enhancers asociados a patologías que han sido validados experimentalmente. Como resultado, se han creado bases de datos para compilar y organizar esta

información, proporcionando una referencia consolidada y accesible para futuras investigaciones [52], [53], [54].

1.1.5. Evolución de los enhancers

La sintenia, definida como la conservación evolutiva del orden génico y la orientación a lo largo de los cromosomas, se ha atribuido a limitaciones impuestas por enhancers y otros elementos regulatorios [55]. Este fenómeno, junto con la alta conservación en la expresión génica entre especies estrechamente relacionadas, podría sugerir un nivel significativo de conservación en los enhancers. Sin embargo, en términos de secuencia, estos elementos reguladores parecen ser en gran medida específicos de cada especie [56]. Un estudio que comparó los paisajes regulatorios *cis*- y *trans*- de muestras de hígado de 20 especies de mamíferos, reveló que los enhancers evolucionan significativamente más rápido que los promotores [57]. Aunque se ha observado una alta tasa de cambio en los enhancers, se ha demostrado que estos poseen una amplia flexibilidad de secuencia para operar en distintas especies. Esto se debe en gran medida al hecho de que la conservación posicional de los motivos de unión de los factores de transcripción no es un requisito esencial para la lógica regulatoria propia del enhancer, por lo que esta plasticidad genómica estaría contribuyendo a la adaptabilidad por medio de mutaciones que no tengan un impacto negativo en los procesos transcripcionales del organismo [55]. Al respecto, enhancers del gen *Isl1* en humanos y ratones comparten un conjunto de motivos de unión a factores de transcripción con las esponjas. Aun cuando estos motivos se encuentran reordenados en estas regiones, los enhancers de *Isl1* de esponjas son capaces de conducir la expresión de reporteros en peces cebras [55]. En contraste a lo anterior, se ha reportado la presencia de elementos denominados enhancers ultraconservados, los cuales parecen ser una excepción a las características evolutivas de estos fragmentos de ADN. La invariabilidad de la secuencia de este tipo de enhancer sugiere un rol funcional crucial [58]. Hasta la fecha, permanece como un enigma las razones por las cuales algunos enhancers son muy divergentes mientras otros presentan una fuerte conservación. Una manera de abordar esta problemática es estudiar enhancers en una gran diversidad de especies y de tejidos.

1.1.6. Técnicas de secuenciación masiva para el estudio de la regulación transcripcional

La implementación de técnicas de secuenciación de alto rendimiento ha facilitado y agilizado la identificación de paisajes regulatorios [59]. Una tecnología pionera en el campo es la “Inmunoprecipitación de Cromatina acoplada a Secuenciación” (**ChIP-seq, Chromatin Immunoprecipitation Sequencing**). Esta metodología posibilita el uso de anticuerpos específicos dirigidos a las marcas de histonas características que flanquean los elementos en *cis*-. A través del proceso de entrecruzamiento, sonicación e inmunoprecipitación, se logra obtener fragmentos de ADN de 200 a 600 pb asociados a estas modificaciones. De esta manera, es factible identificar regiones marcadas con H3K4me3 en promotores activos, H3K4me1 y H3K27Ac en enhancers

activos, y H3K27me3 en regiones relacionadas a la represión génica (Figura 2B) [60]. La técnica de ChIP-seq aplicada a marcas de histonas ha permitido profundizar en cómo el paisaje regulatorio contribuye a la identidad celular [61] y la especificación de linaje [62], [63].

Un enfoque más reciente para investigar la regulación transcripcional implica evaluar la accesibilidad de la cromatina, destacando el "Ensayo de Secuenciación de Cromatina Accesible por Transposasa" (**ATAC-seq, Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing**). Esta técnica emplea una transposasa Tn5 genéticamente modificada, que no solo fragmenta la cromatina en regiones accesibles, sino que también incorpora adaptadores que sirven como templado para la posterior amplificación de librerías para secuenciación (Figura 2A) (Buenrosto et al., 2015). Desde su introducción, esta técnica ha experimentado un rápido crecimiento en su aplicación en estudios relacionados con la identificación de elementos regulatorios. Esto se debe en gran medida a que el ATAC-seq es un método sencillo, sensible y eficiente en tiempo, necesitando solo de 500 a 50.000 células como material de entrada, lo que contrasta con otras técnicas similares, como DNase-seq y FAIRE-seq, las cuales requieren millones de células para llevar a cabo el proceso [65]. A través de estudios con ATAC-seq se han elaborado atlas de regiones de cromatina abierta en diversos tejidos de mamíferos [66], [67], así como en 8 etapas distintas del proceso de regeneración de extremidades en el axolotl [68]. Dada la naturaleza de la Tn5 hiperactiva, se han optimizado programas bioinformáticos para extraer, a partir del ATAC-seq, el posicionamiento de los mononucleosomas que rodean a las RLN y las huellas de los factores de transcripción que se unen en estas secuencias, posibilitando una exploración más detallada de la dinámica de la cromatina [69].

En muchas ocasiones, una técnica de secuenciación masiva por si sola requiere de la integración de otra para obtener resultados robustos. Por ejemplo, una región de cromatina abierta tejido-especifica identificada por ATAC-seq puede ser correlacionada con una alta señal transcripcional del gen más cercano cuantificada por RNA-seq, y así clasificarla como un enhancer putativo. Basándose en el cruce de la accesibilidad a la cromatina y los niveles de expresión, se ha logrado determinar de una manera mucho más precisa el panorama genético de distintos tipos celulares humanos [70], [71]. Adicionalmente, se ha logrado filtrar enhancers a través de la integración de ATAC-seq y la marca de histona H3K27ac en células embrionarias de ratón [72].

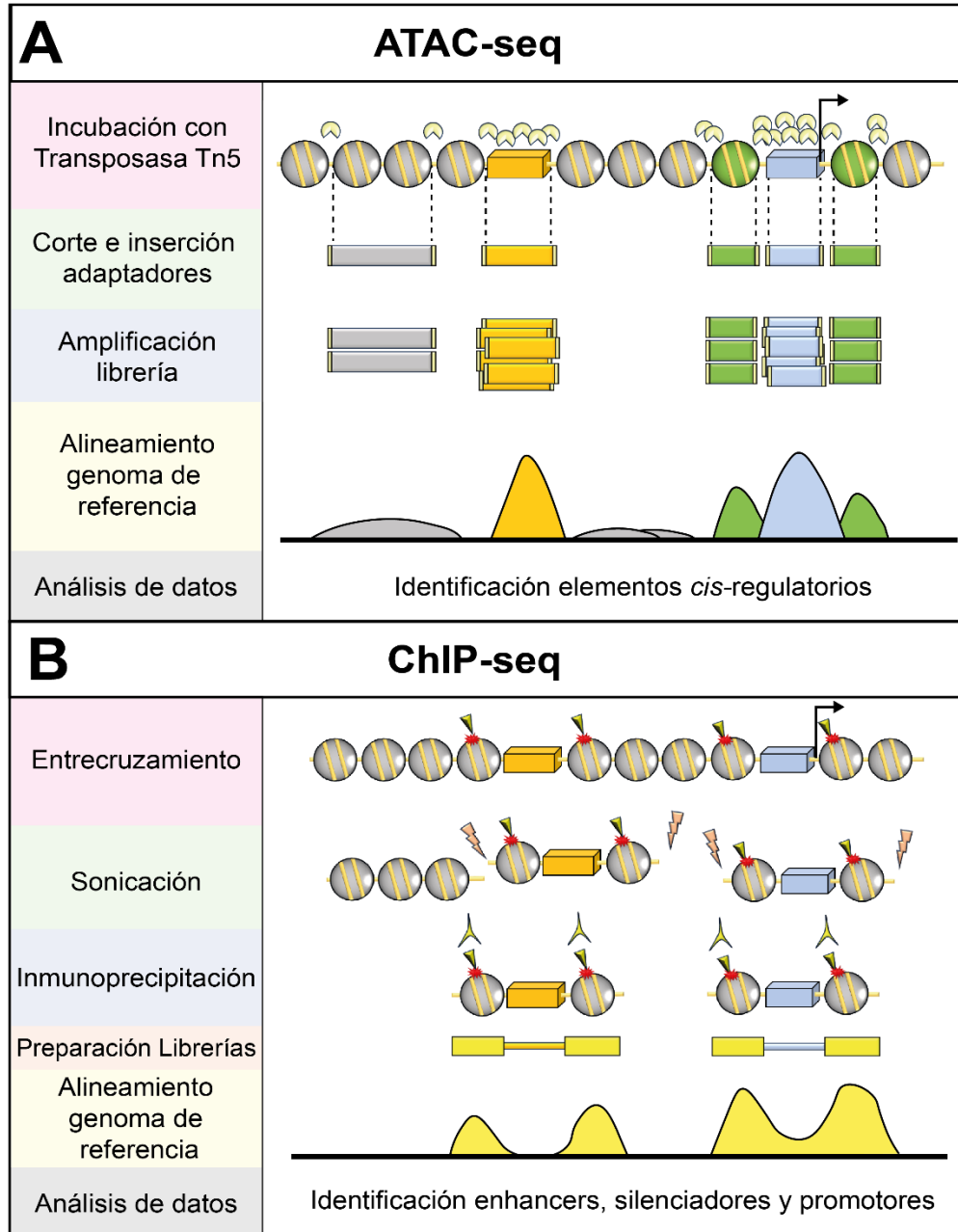


Figura 2. Técnicas de secuenciación masiva para la identificación de elementos *cis*-regulatorios. **(A)** El ATAC-seq implica la incubación de la cromatina con la transposasa hiperactiva Tn5, que no solo fragmenta el ADN en regiones de cromatina abierta, sino que también inserta adaptadores, actuando como cebadores para la amplificación de las librerías. Este enfoque permite la identificación de elementos *cis*-regulatorios, aunque no proporciona información detallada sobre su categorización. **(B)** En el ChIP-seq, se efectúa un entrecruzamiento entre las proteínas y el ADN, seguido de una sonicación para romper la cromatina. Posteriormente, se realiza una inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos que reconocen marcas clásicas de histonas. Esta estrategia facilita la identificación de enhancers, promotores y silenciadores.

1.2. Mecanismos celulares y moleculares de la regeneración tisular en vertebrados

1.2.1. Bases celulares de la regeneración tisular

Es frecuente que los animales tengan la capacidad de regenerar partes del cuerpo que se han perdido o dañado, aunque la capacidad de esta habilidad varía dependiendo del tejido y especie [73]. En vertebrados, mientras que los anfibios y peces son capaces de regenerar estructuras esqueléticas complejas, así como el cerebro y el corazón, los mamíferos tienen una capacidad regenerativa más limitada respecto a los tejidos mencionados [74]. Ante una lesión tisular, las células orquestan la estimulación de la proliferación y diferenciación durante procesos que recapitulan varios eventos del desarrollo embrionario y larval. Sobre esto, se ha observado que una reserva de células madre se activa en respuesta al daño, llevando a cabo tanto la auto-renovación como la diferenciación, lo que da lugar a células especializadas [75]. En anfibios, la exitosa regeneración de extremidades amputadas se debe a la formación de un blastema, una masa avascular de células indiferenciadas que guarda similitud con el brote embrionario de la extremidad en desarrollo [76], [77]. Así, las células del blastema recapitulan la expresión de genes clave para el desarrollo temprano de las patas como *prod1* en axolotl [78] y *tbx5* y *prx1* en *Xenopus laevis* [79]. El blastema favorece el crecimiento en dirección proximal a distal, permitiendo que los nuevos tejidos se reconecten al muñón y la extremidad se regenere por completo [80]. Por otra parte, en situaciones en las que no hay amputación y se enfrenta a daño o resección de alguna parte de un órgano o tejido, la formación del blastema puede ocurrir en algunas ocasiones y en otras no. Independientemente de la estrategia adoptada, las células, según el tejido y la especie, aportan al proceso de regeneración por medio de dos posibles mecanismos distintos a los observados durante el desarrollo temprano [81]. En el primer mecanismo, se presenta la dediferenciación, donde células previamente diferenciadas pierden su madurez para adquirir propiedades de células progenitoras. Estas células dediferenciadas proliferan y, eventualmente, se rediferencian en los tipos celulares originales [82]. En términos generales, la dediferenciación ocurre dentro del mismo linaje celular, sin que células de diferentes líneas contribuyan a la regeneración. El segundo mecanismo implica que las células diferenciadas cambien sus identidades tras una lesión, generando estados celulares transitorios, como células de reparación, o transformándose en otros tipos celulares mediante procesos conocidos como transdiferenciación o reprogramación celular adaptativa [83], [84], [85].

1.2.2. Microambiente inmune asociado a la regeneración tisular

Las células del sistema inmunológico desempeñan un papel clave en la regulación de la homeostasis tisular, al mismo tiempo que las células del tejido ejercen influencia sobre la supervivencia y función de las células inmunológicas. Después de un daño tisular, suele desencadenarse casi

inmediatamente una respuesta inmunológica [86]. La primera fase de esta respuesta implica componentes del sistema inmunológico innato, los cuales brindan una defensa inmediata contra posibles patógenos que puedan invadir el tejido afectado. No obstante, incluso en ausencia de patógenos, la respuesta inmunológica, inicialmente desencadenada por señales de peligro liberadas desde los tejidos dañados, da lugar a lo que se conoce como inflamación estéril [87]. En la mayoría de los tejidos, la respuesta inmunológica innata ejerce una influencia significativa en el proceso de regeneración. Un ejemplo de esto es el papel que desempeñan los macrófagos en la restauración de la homeostasis tisular, encargándose de eliminar los restos celulares, remodelar la matriz extracelular (MEC) y sintetizar múltiples citoquinas y factores de crecimiento [88]. Después de la respuesta inmunológica innata, se pone en marcha el sistema inmunológico adaptativo, donde destaca la función de los linfocitos T, los cuales pueden tener efectos beneficiosos o inhibitorios en la regeneración de tejidos. En el contexto óseo, existen pruebas que indican que tanto las subpoblaciones de células CD4+ como las CD8+ pueden retrasar la regeneración [89]. Por otro lado, las células T reguladoras CD4+ (Tregs) desempeñan un papel crucial en la reparación y regeneración de diversos tejidos, incluyendo piel, hueso, pulmones, riñón, músculo esquelético y músculo cardíaco [88], [90].

Adicionalmente, estudios sugieren que las células mesenquimales tienen una comunicación cruzada con las células del sistema inmunológico que afectaría el proceso de regeneración [91]. En pez cebra (*Danio rerio*), la lesión traumática en el cerebro induce una respuesta inflamatoria y activa las microglías (células inmunológicas residentes en el tejido cerebral) y los leucocitos. La secreción de LTC4 por parte de las células del sistema inmunológico activa la proliferación de las células gliales radiales (células progenitoras neuronales), promoviendo la regeneración neuronal [92]. Asimismo, se ha indicado que los macrófagos fomentan la dediferenciación, dando lugar a la formación de un conjunto de células progenitoras que facilitan la regeneración de extremidades en las salamandras (Godwin et al., 2013).

1.2.3. Enhancers específicos modulan la regeneración tisular

Aunque se han identificado enhancers del desarrollo de corazón que son utilizados para dirigir la regeneración en el tejido cardíaco [94], lo que demuestra una superposición de mecanismos de regulación génica entre el desarrollo y la regeneración, existen procesos únicos en cada contexto. Eventos como el cierre de heridas, la activación del sistema inmunológico y los cambios en el destino celular inducidos por el daño, como la dediferenciación y transdiferenciación, son propios de la regeneración [95]. En consecuencia, requieren de un programa regulatorio exclusivo. De hecho, existe evidencia que respalda la existencia de enhancers que modulan de manera específica los procesos regenerativos en varios modelos de vertebrados [96]. A partir de esto, **los enhancers de regeneración tisular (ERT)** pueden ser clasificados en tres categorías: **i)** aquellos activados durante el desarrollo y reactivados por lesiones, **ii)** elementos que inducen la expresión preferentemente

durante la regeneración en diversos tejidos, y **iii**) elementos específicos de la regeneración limitados a tejidos particulares [97]. En un estudio con ratones, se identificaron múltiples fragmentos genómicos a lo largo del locus de *bmp5* que coordinan la expresión de este gen durante el desarrollo de numerosos tejidos, incluyendo las costillas. Sin embargo, mediante ensayos con ratones transgénicos *lacZ* también se detectó un elemento único, diferente a los anteriores, que activa la expresión de *bmp5* después de la fractura de costillas en animales adultos (Figura 3A). Este mismo elemento de respuesta a lesiones induce la expresión génica en células mesenquimales tras la fractura de la tibia, en queratinocitos migratorios después de heridas en la piel dorsal y en células epiteliales en la regeneración posterior a lesiones pulmonares [98]. También en ratones se identificaron enhancers que se activan solo frente a una inflamación, potenciando la regeneración de epidermis luego de una lesión [99].

Con respecto a vertebrados no mamíferos, en *Xenopus laevis* se han identificado enhancers que activan la expresión de *shh* y *prx1* tanto en el desarrollo como en la regeneración de pata [100], [101], además de una región que podría estar activando la expresión de *lhx1* en riñón frente a una nefrectomía parcial [102]. A través de ATAC-seq y peces cebra transgénicos se validaron nuevos ERT cerca de genes inducidos durante la regeneración de las aletas, incluyendo *fgf20a*, *mdka* y *cx43* [103]. En el contexto de lesiones de corazón y aletas de *Danio rerio*, se observa una expresión significativa de *leptina b* (*lepb*), acompañada por un enriquecimiento de la marca de histona H3K27ac en una secuencia corta corriente arriba de este gen. La actividad de este enhancer putativo fue efectuada mediante un ensayo con un reportero transgénico, el cual evidenció que este elemento regulador, al interactuar con diversos promotores mínimos, tiene la capacidad suficiente para activar la expresión de *lepb* en las aletas y el corazón durante el proceso de regeneración, sin mostrar actividad durante el desarrollo (Figura 3B) [97]. En una investigación reciente, se emplearon los ERT reconocidos en pez cebra para guiar la expresión de genes clave en tejido cardíaco dañado de mamíferos adultos. Los resultados de esta terapia génica destacaron un marcado reconocimiento de los ERT por parte del tejido murino en proceso de regeneración, con una mejora significativa en las funciones cardíacas [104]. Estos hallazgos respaldan la perspectiva de que la identificación de paisajes regulatorios asociados a procesos regenerativos específicos podría tener aplicaciones prometedoras en la terapia de daños tisulares humanos con recuperación limitada o nula.

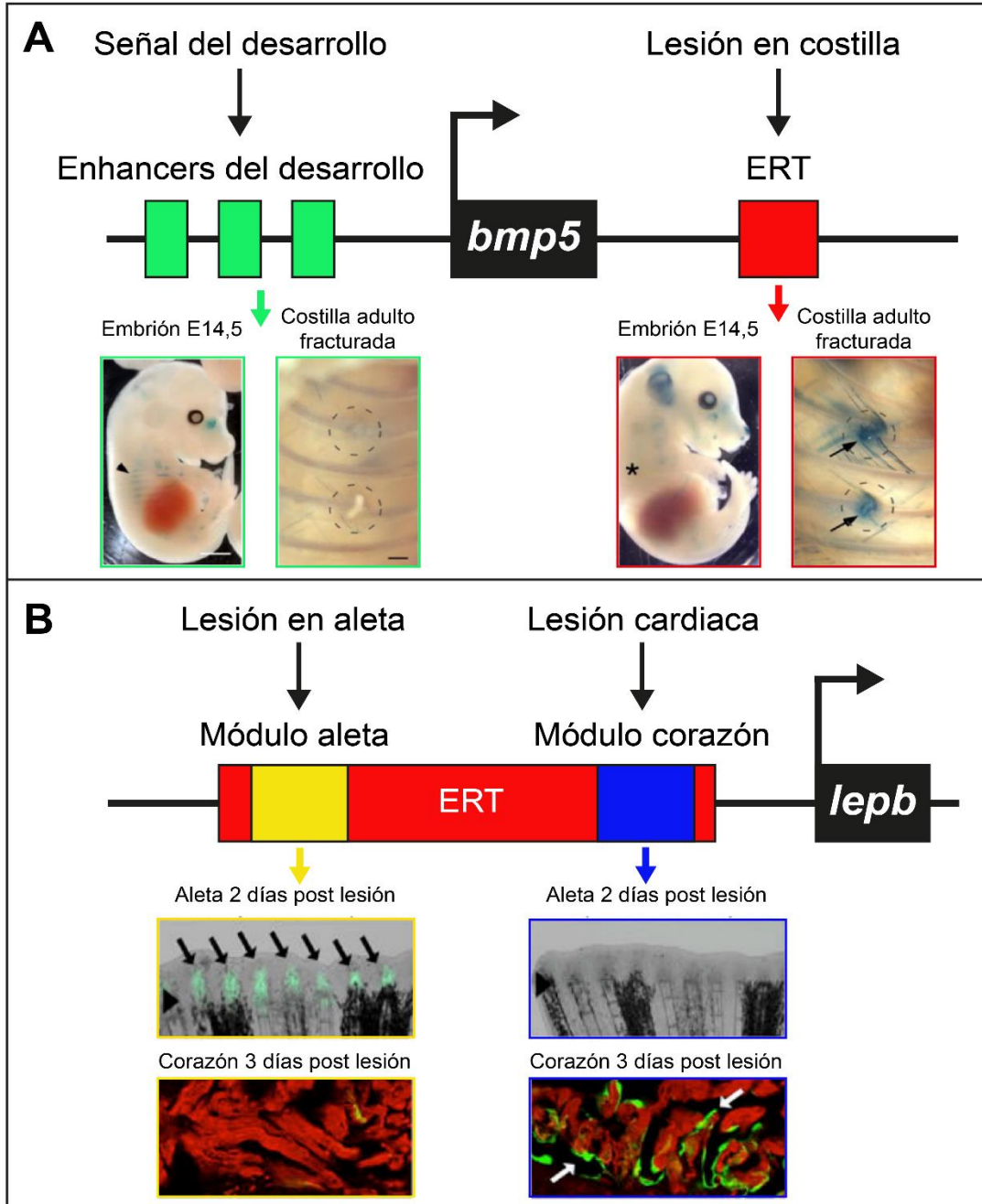


Figura 3. Enhancers específicos se activan en respuesta a lesiones. **(A)** En ratón, la expresión de *bmp5* durante el desarrollo está regulada por múltiples enhancers localizados corriente arriba de este gen. La expresión de *bmp5* inducida por lesiones en las costillas no es controlada por estos elementos de desarrollo, sino que por un enhancer de regeneración tisular (ERT) ubicado corriente abajo de este gen. **(B)** En pez cebra, la expresión de *lepb* está regulada por un enhancer que alberga módulos de regeneración tejido-específicos, los cuales se activan en respuesta a diversas lesiones, incluyendo aletas y corazón.

1.3. Desarrollo, evolución y regeneración del tejido óseo

El esqueleto es una innovación distintiva de los vertebrados que está compuesto de un tejido dinámico sometido a constante formación y remodelación [105]. Este desempeña roles vitales para el organismo, proporcionando soporte estructural, garantizando la protección del cuerpo y gestionando las reservas minerales [106], lo que lo posiciona como un fascinante modelo de estudio en los ámbitos del desarrollo, la evolución y la medicina regenerativa.

1.3.1. Aspectos celulares y moleculares de la esquelotogénesis

Los **osteoblastos** son las células responsables de secretar proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo I, osteopontina y osteocalcina, generando un ambiente bioquímico adecuado para la formación del hueso. La matriz ósea resultante, aún no mineralizada, se conoce como osteoide, y madura a medida que se depositan sales minerales como la hidroxiapatita de calcio [107]. Cuando los osteoblastos quedan completamente rodeados por la matriz ósea, se encapsulan, experimentando su diferenciación a osteocitos. Estas células tienen la capacidad de establecer conexiones, dando lugar a una intrincada red multicelular que se extiende por todo el hueso mineralizado [108], [109], [110]. A nivel embrionario, el tejido óseo se forma a través de dos procesos distintos. Los huesos largos se originan mediante osificación endocondral, donde células mesenquimáticas dan forma a un molde de cartílago, el cual posteriormente es osificado y mineralizado por la actividad de los osteoblastos [111]. En contraste, los huesos planos, como el cráneo, son formados por osificación intramembranosa, un mecanismo en el cual células provenientes de la cresta neural desarrollan una membrana mesenquimática blanda que se convierte progresivamente en hueso a través de la diferenciación de osteoprogenitores a osteoblastos y finalmente a osteocitos (Figura 4) [105], [112].

En un contexto molecular, los osteoblastos se caracterizan por expresar genes relacionados con la mineralización, tales como *bglap* y *bsp*, además del factor de transcripción *Osterix/Sp7* [113], [114]. Por otra parte, las células mesenquimáticas osteogénicas expresan *sox2*, factor de transcripción que está restringido a este tipo celular y que contribuye a la mantención de un estado indiferenciado mediante la inhibición de la vía de señalización Wnt [115]. En adición, hay factores de transcripción que pueden estar presentes en ambos tipos celulares. Un caso emblemático es el gen *runx2*, que es esencial para el compromiso inicial de las células mesenquimales con el linaje osteoblástico [116]. Se ha observado que los ratones *knockout* para *runx2* generan osteoblastos anómalos, resultando en un esqueleto cartilaginoso que no experimenta calcificación [117], [118]. Otro grupo de genes esencial para la formación ósea es la familia *dlx*. La expresión de sus miembros experimenta cambios dinámicos a lo largo del proceso de diferenciación osteoblástica en ratones. Mientras *dlx2* exhibe niveles elevados de expresión en estadios mesenquimales, *dlx3*, *dlx5* y *dlx6* se expresan de manera robusta en osteoblastos, siendo *dlx3* el único expresado en osteocitos [119]. Sobre este último tipo celular, se ha descrito que expresa de manera específica el gen *dmp1* (Figura 4) [109].

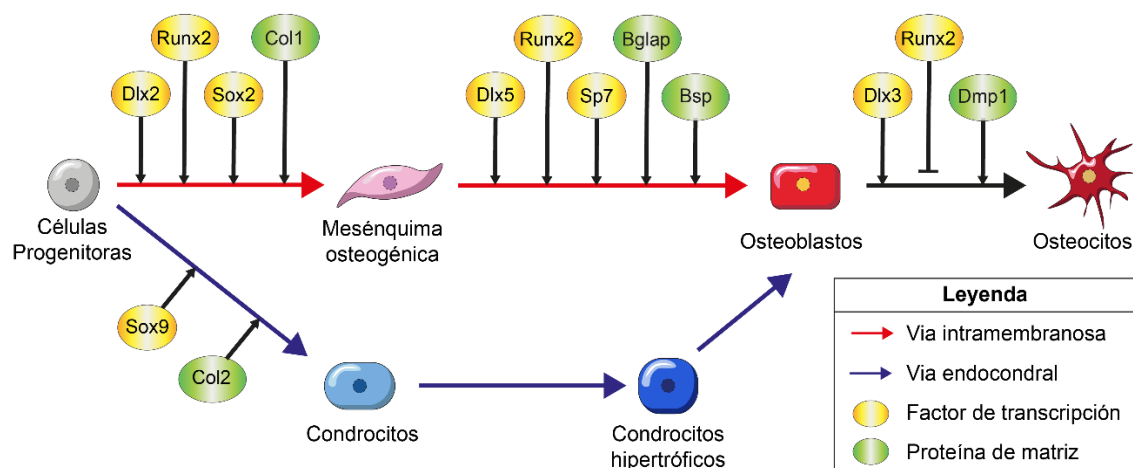


Figura 4. Mecanismos de desarrollo óseo. En la osificación intramembranosa, las células mesenquimales osteogénicas, al dejar de expresar *sox2*, se diferencian directamente en osteoblastos, expresando genes de matriz como *bglap* y *bsp*, además del factor de transcripción *sp7*. Por otro lado, en la osificación endocondral, las células progenitoras dan origen a condrocitos, lo que activa la expresión de *sox9*. Posteriormente, los condrocitos experimentan hipertrofia y se transdiferencian en osteoblastos [85]. Estas células, a su vez, se incrustan en la matriz y se diferencian en osteocitos, que se caracterizan por expresar *dmp1*.

1.3.2. Regulación transcripcional de genes óseos

Hasta la fecha, existen pocas investigaciones que profundizan en la lógica regulatoria asociada a la osteogénesis. Se ha identificado un enhancer que dirige la expresión de *runx2* en osteoblastos; esta región reguladora cuenta con sitios de unión a *Dlx5* y *Mef2*, proteínas esenciales para el desarrollo normal del tejido esquelético [120]. Utilizando ratones transgénicos, se identificó que *sost*, un gen clave para mantener la homeostasis del hueso, posee un elemento regulador a 62kb de su SIT [121]. A través de análisis de ChIP-seq en osteoblastos, se ha determinado la ocupación de *runx2* en regiones distintas al promotor [122] y se han definido enhancers donde se une un complejo formado por *Dlx5* y *Sp7*, estimulando así la diferenciación de osteoblastos [123]. En un estudio reciente, se identificaron factores de transcripción que son activados por la vía BMP, crucial para la formación de hueso [124]. Mediante ATAC-seq y RNA-seq caracterizaron el perfil de cromatina abierta de osteoblastos en cultivo, centrándose especialmente en los objetivos de *bmp2*. Como resultado, se identificó a *Klf4* como un nuevo factor de transcripción implicado en el proceso de diferenciación osteoblástica [125].

El limitado número de trabajos que hay sobre la regulación transcripcional del linaje osteoblástico han estado mayormente centrados en mamíferos, con una atención limitada hacia otros organismos, como los anfibios. **Explorar el paisaje regulatorio en estas especies no solo enriquecería**

nuestro conocimiento sobre el desarrollo y evolución ósea, sino que también podría ofrecer perspectivas valiosas sobre los mecanismos moleculares que subyacen a su alto potencial para regenerar elementos esqueléticos.

1.3.3. Origen evolutivo del esqueleto y su capacidad regenerativa

Para obtener una comprensión más completa de las diferencias en la plasticidad ósea entre las especies, es fundamental explorar el origen evolutivo del hueso. El esqueleto más antiguo en la línea evolutiva de los vertebrados fue un endoesqueleto cartilaginoso no mineralizado, mientras que las estructuras mineralizadas más antiguas fueron estructuras similares a dientes [126]. Un análisis detallado del esqueleto dérmico en fósiles del periodo Silúrico-Devónico, que abarca hace 443-360 millones de años, revela que el hueso emergió antes de la proliferación de osteíctios (celacanto, gar, peces teleósteos, anfibios y amniotas) y vertebrados con mandíbula, como condriictios (tiburones y rayas) [127]. Mientras los condriictios poseen un esqueleto principalmente cartilaginoso, con estructuras mineralizadas remitidas a los dientes, los osteíctios presentan un esqueleto interno compuesto mayormente por piezas calcificadas [128].

Ahora bien, la capacidad regenerativa del hueso presenta una notable variabilidad en la línea evolutiva de los vertebrados [129]. Algunas clases y géneros exhiben una sorprendente habilidad para regenerar incluso amputaciones, la evidencia más antigua de esta facultad se observa entre algunos peces pulmonados y el actinopterigio basal *Polypterus* [130], pero al parecer se halla ausente en los condriictios. Los peces teleósteos tienen la capacidad de regenerar los rayos de las aletas y el cráneo después de sufrir daños [131]. Mientras los anuros, en su estado larval, pueden regenerar eficientemente tejido óseo, los urodelos muestran una impresionante capacidad para regenerar extremidades amputadas incluso en etapas adultas [132], [133]. En el caso de los amniotas, como mamíferos y aves, la regeneración de extremidades no es posible, aunque se ha demostrado una capacidad regenerativa limitada en las puntas distales de los dedos de ratones y pollos prenatales [134]. Además, se ha observado la reparación de fracturas y lesiones por debajo del tamaño crítico en estas especies.

1.3.4. Regeneración ósea

1.3.4.1. Regeneración ósea endocondral

Después de una fractura de un hueso largo se inicia una fase inflamatoria que recluta células de la sangre periférica e intramedular. Se forma un hematoma, seguido por la incorporación de células madre mesenquimales que aportan a la generación de un callo blando cartilaginoso. La angiogénesis y revascularización permiten la transformación de la matriz cartilaginosa en tejido óseo, reemplazando el callo blando con uno duro. Los osteoclastos, células multinucleadas del linaje de los monocitos, reabsorben la matriz, mientras que los osteoblastos depositan mineral, remodelando

el callo duro y sustituyendo el hueso trabecular por el hueso laminar final [135], [136]. Cabe destacar que, durante este proceso de remodelación, las metaloproteinasas de matriz, como Mmp2, Mmp9 y Mmp13, son cruciales para la viabilidad y funcionalidad de los osteoclastos, osteoblastos y osteocitos [137].

Xenopus laevis ha sido empleado para evaluar la eficacia de andamios tratados con BMP4 y VEGF con el objetivo de acelerar la regeneración ósea tras una extirpación de tarso [138]. Uno de los modelos más utilizados en el estudio de regeneración de huesos largos es el ajolote. Sin embargo, aunque estos urodelos tienen la capacidad para regenerar extremidades tras la amputación, resulta llamativo que no logren reparar fracturas de tamaño crítico. Se destaca que, mientras en la formación del blastema post-amputación se produce un proceso de dediferenciación de las células osteoblásticas, este mecanismo celular no está presente en las fracturas (Tabla 1). **Se postula que la dediferenciación podría ser un elemento crucial para una regeneración ósea eficiente y efectiva** [139], [140].

1.3.4.2. Regeneración ósea intramembranosa

Después de una lesión ósea en el cráneo de los mamíferos, se activa una cascada inflamatoria que induce la diferenciación de macrófagos hacia los subtipos M1 (inflamatorios) y M2 (antiinflamatorios). La polarización de estos macrófagos regula el reclutamiento de células endoteliales y progenitoras, contribuyendo así a la formación de un tejido fibroso altamente vascularizado [141], [142]. Finalmente, las células mesenquimáticas osteogénicas experimentan una diferenciación gradual en osteoblastos, los cuales se encargan de concretar la mineralización y de esa forma regenerar el hueso dañado [143]. Pocos estudios han abordado la remodelación ósea relacionada con procesos regenerativos intramembranosos, lo que ha dejado un vacío significativo en el entendimiento sobre la participación de los osteoclastos en este tipo de regeneración.


























En ratones y ratas, un ensayo clásico de regeneración intramembranosa implica perforar una lesión circular a través del hueso del cráneo y monitorear cómo la osificación se propaga progresivamente a través del área dañada [144]. Por lo general, estos estudios se orientan hacia la mejora de la tasa de regeneración a través de procedimientos quirúrgicos, donde se implanta material sintético en la lesión para favorecer la diferenciación de células madre procedentes de fuentes externas [145]. En una investigación realizada con ratones, se observó que las células mesenquimáticas que expresan *Prx1* residen exclusivamente en un nicho celular ubicado en la sutura craneal. Estas células, junto con su progenie, son las responsables de la regeneración efectiva de pequeños defectos óseos en el cráneo (Tabla 1) [146], [147]. Aunque investigaciones en ratones indican que la regeneración ósea intramembranosa se atribuye a un nicho de células mesenquimáticas que se diferencian en osteoblastos, se ha observado una marcada disminución en la capacidad de reparación con el envejecimiento, sin contar que lesiones que superan un tamaño crítico no muestran capacidad

regenerativa. Por otro lado, especies con un mayor potencial para regenerar elementos esqueléticos exhiben mecanismos que difieren de los vistos en mamíferos.

A través de ensayos de linaje con peces cebra transgénicos, se ha evidenciado que, tras una lesión craneal, **los osteoblastos maduros que rodean la perforación experimentan un proceso de dediferenciación**. Este fenómeno se distingue por una reducción en la expresión de marcadores de diferenciación, como *bglap*, un incremento en la expresión de marcadores asociados al estado de mesénquima osteogénica y una transición hacia un estado proliferativo, lo que permite la regeneración efectiva del cráneo (Tabla 1) [148].

Adicionalmente, **nuestro grupo de trabajo ha implementado el primer ensayo de regeneración ósea craneal en *Xenopus tropicalis*** [149]. Se ha observado que la completa deposición de matriz ósea en una herida ocurre en un periodo de 15 días post lesión (Tabla 1), destacando una tasa de regeneración más eficiente en comparación con la reportada en mamíferos [147], [149]. Este modelo experimental proporciona una configuración idónea para explorar la regeneración ósea desde una perspectiva de regulación génica.

Tabla 1. Comparación de la regeneración de estructuras óseas y sus mecanismos entre mamíferos, peces y anfibios.

Modelo	Pregunta	Amputación extremidad	Amputación cola o aleta	Fractura hueso endocondral	Lesión cráneo
 <i>Mus musculus</i>	Regenera				
	Mecanismo	No aplica	No aplica	<ul style="list-style-type: none"> Formación callo Reserva células mesenquimales 	Reserva células mesenquimales
 <i>Danio rerio</i>	Regenera				
	Mecanismo	No aplica	<ul style="list-style-type: none"> Dediferenciación Formación blastema 	No descrito	Dediferenciación
 <i>A. mexicanum</i>	Regenera				
	Mecanismo	<ul style="list-style-type: none"> Dediferenciación Formación blastema 	<ul style="list-style-type: none"> Dediferenciación Formación blastema 	Reserva células mesenquimales	No descrito
 <i>Xenopus</i>	Regenera				
	Mecanismo	No aplica	Reserva células mesenquimales	No descrito	No descrito
Leyenda	 No aplica	 No descrito	 No regenera	 Regenera lesiones menores	 Regeneración completa

1.4. *Xenopus tropicalis* como modelo para estudios de desarrollo y regeneración ósea

1.4.1. Generalidades del modelo

La fecundación de *Xenopus tropicalis* es externa, lo que permite la observación de las distintas etapas de desarrollo. En comparación con otros vertebrados, este organismo presenta un desarrollo rápido. Además, los embriones, e incluso las larvas, son transparentes y tienen una baja pigmentación, lo que posibilita el estudio *in vivo* de órganos y tejidos con gran claridad. En el ámbito molecular, el genoma de *Xenopus tropicalis* es diploide, con un tamaño aproximado de 1,7 Gb distribuidos en 10 cromosomas. Este genoma alberga una rica diversidad de información genética, contando con más de 20.000 genes que codifican proteínas, entre ellos ortólogos de al menos 1.700 genes vinculados a enfermedades humanas [150]. Es relevante destacar que más de un tercio del genoma está compuesto por elementos transponibles, distinguiéndose la notable prevalencia de transposones de ADN [151]. Asimismo, se aprecia un enriquecimiento de elementos no codificantes conservados en tetrápodos [150].

1.4.2. Formación de hueso frontoparietal de *Xenopus tropicalis*

En estadios embrionarios, las células de la cresta neural craneal migran y contribuyen a la formación de un tejido mesenquimático osteogénico localizado en la cabeza. Cuando las larvas de *Xenopus tropicalis* alcanzan el estadio premetamórfico NF51 [152], esta membrana mesenquimática comienza a mineralizar bilateralmente desde los extremos hacia el centro, hasta que en el estadio premetamórfico NF58 osifica por completo (Figura 5) [153].

Cabe mencionar que el patrón de suturas del cráneo en *Xenopus* difiere del de especies mamíferas o aves, principalmente debido a que los huesos frontal y parietal están fusionados, formando una sola estructura mineralizada denominada hueso frontoparietal o calvaria provista de una sutura media [154].

Dado que la calvaria es visible y fácilmente accesible en estadios premetamórficos, se convierte en una estructura esquelética ideal para realizar estudios de manipulación genética y farmacológica, seguimientos con marcadores, ensayos de regeneración y adquisición de muestras para realizar análisis genómicos y transcriptómicos.

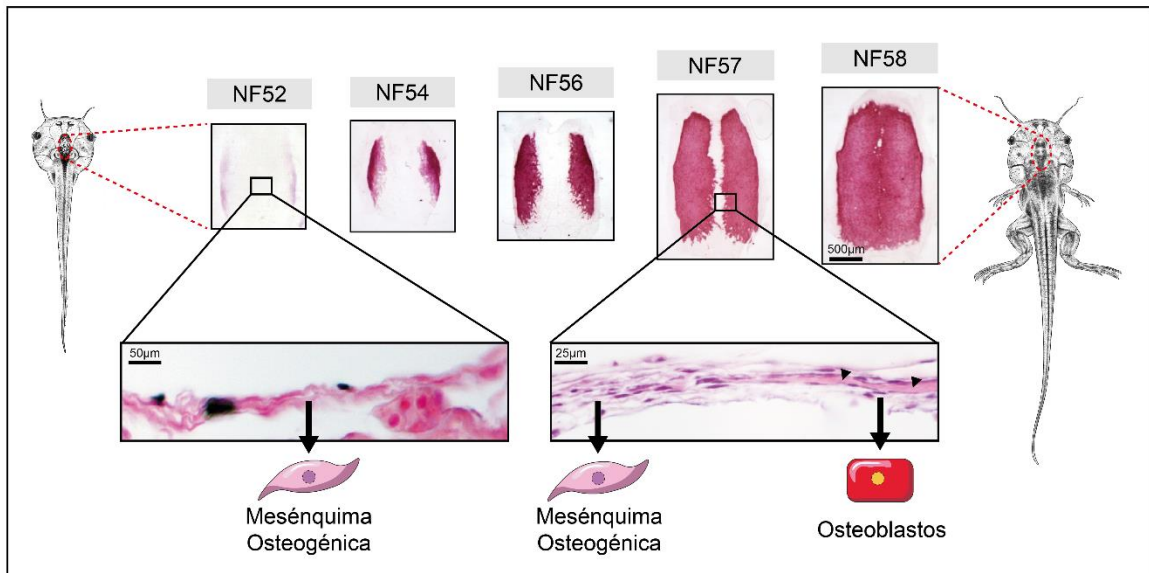


Figura 5. Osteogénesis de la calvaria de *Xenopus tropicalis*. La tinción con el quelante de calcio Alizarin Red revela la mineralización bilateral del hueso frontoparietal, el cual culmina en el completo cierre en el estadio NF58. La mineralización resulta de la diferenciación gradual de las células osteoprogenitoras que conforman la membrana craneal, siendo evidenciada por las puntas de flecha que indican la deposición de mineral.

1.4.3. Estudios de regulación transcripcional en *Xenopus tropicalis*

Recientemente, una serie de investigaciones ha empleado ATAC-seq para dilucidar el paisaje regulatorio asociado al desarrollo de *Xenopus tropicalis*. Se ha caracterizado la dinámica de la accesibilidad de la cromatina de la capa animal de la gástrula temprana y la zona marginal dorsal [155], así como del mesodermo [156]. Además, realizando ATAC-seq a embriones de híbridos inviables de *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis*, se han identificado las regiones de cromatina abierta donde se une la proteína p53, principal reguladora de la alta mortalidad embrionaria de estos híbridos [157].

Esta técnica también ha sido utilizada para estudiar la regeneración de cola de larvas de *Xenopus tropicalis*. Al respecto, se integraron resultados de accesibilidad de la cromatina y RNA-seq de célula única, pudiéndose identificar reguladores génicos, como Pbx3 y Meis1, vinculados a progenitores neurales. Ambos mostraron fenotipos de pérdida de función, como regeneración de cola reducida y desorganización de tejidos neurales regenerados [158].

1.5. Hipótesis y objetivos

A modo de resumen, hemos visto que:

- Los enhancers corresponden a secuencias en *cis*- que integran un código regulatorio que conducen a la activación transcripcional de su gen blanco.
- Algunos enhancers presentan una actividad específica del desarrollo embrionario, otros se activan exclusivamente durante la regeneración, y otra categoría cumple un rol en ambos procesos.
- A nivel celular, se ha observado que algunas especies no mamíferas, como el pez cebra, son capaces de regenerar el cráneo mediante la dediferenciación de osteoblastos, para luego recapitular los mecanismos de desarrollo embrionario del hueso.
- Nuestro laboratorio ha implementado un modelo de regeneración craneal en *Xenopus tropicalis*, especie que es capaz de cubrir la región lesionada con una delgada capa de hueso en 15 días. Sin embargo, se desconocen los mecanismos celulares y moleculares.
- A pesar del avance en técnicas como ATAC-seq y RNA-seq, que combinadas permiten identificar elementos regulatorios y perfiles transcriptómicos, todavía existe poca información sobre el programa genético del desarrollo y la regeneración ósea.
- Sobre estos antecedentes, y considerando que no se han identificado enhancers específicos de la regeneración en *Xenopus*, formulamos la siguiente **hipótesis**:

El proceso de regeneración ósea intramembranosa en *Xenopus tropicalis* consiste en la reactivación de un programa genético propio de la diferenciación osteoblástica observada en un contexto de desarrollo.

Objetivo General:

Comparar los programas genéticos que gobiernan el desarrollo óseo craneal y su regeneración frente a un daño en *Xenopus tropicalis*.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el paisaje regulatorio de osteoblastos de hueso frontoparietal de *Xenopus tropicalis*.
2. Contrastar los paisajes regulatorios desplegados durante el desarrollo craneal y el proceso de regeneración ósea intramembranosa en *Xenopus tropicalis*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Consideraciones bioéticas y lesión craneal

El comité de ética de la Universidad de Concepción aprobó todo procedimiento experimental que se realizó en este estudio, los cuales fueron realizados siguiendo las normas establecidas en el manual de bioseguridad y bioética de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT, Gobierno de Chile).

Tanto los ejemplares adultos como los renacuajos de *Xenopus tropicalis* (*Xt*) fueron mantenidos en la Universidad de Concepción siguiendo protocolos estándar para esta especie. Los embriones fueron obtenidos mediante apareamiento natural y artificial y los estadios de desarrollo fueron definidos de acuerdo con el trabajo de Nieuwkoop and Faber [152]. Para efectuar los ensayos de lesión craneal, se eligieron larvas premetamórficas en estadio NF58, las cuales fueron anestesiadas en 200 mg/mL de metasulfato de tricaina (MS-222, Sigma) [159] y colocadas cuidadosamente con sus cabezas expuestas hacia arriba bajo una lupa de disección binocular. El hueso frontoparietal fue perforado manualmente utilizando un microtaladro de 0,5 mm (Fine Science Tools). Posteriormente, los renacuajos operados fueron trasladados a un acuario de 1 litro, donde recuperaron la movilidad y se mantuvieron durante 5 o 15 días post lesión (dpl) [149].

2.2. Preparación librerías de ATAC-seq

2.2.1. Disgregación de tejidos

Se disecaron 7 tejidos distintos, incluyendo: i) La región en proceso de regeneración a 5dpl y ii) 15dpl desde 12 larvas con lesión craneal, iii) mesénquima osteogénica intramembranosa desde 40 larvas NF52, iv) hueso frontoparietal desde 15 larvas NF58, v) corazón, vi) pulmón e vii) hígado desde 5 larvas NF58. Cada tejido se transfirió a tubos diferentes que contenían 0,6X HBSS (HyClone). El sobrenadante fue removido y los tejidos fueron tratados con 200µL de colagenasa P (Roche) al 0,1% en HBSS 0,6x por 40 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 200µL de tripsina (Gibco) 0,125% y colagenasa P 0,1% en HBSS 0,6x dejando los tubos a temperatura ambiente en agitación suave por 10 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se realizó un tratamiento con tripsina 0,25%, y colagenasa P 0,1% en HBSS 0,6X por 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Este último paso de extracción se realizó cuatro veces, y todos los sobrenadantes se agruparon en tubos que contenían 1 mL de medio L-15 (Leibovitz-15, HyClone) 0,6X (Figura 6) [160].

2.2.2. Reacción de transposición

Las células colectadas en el punto 2.2.1 fueron centrifugadas a 500xg durante 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se les removió el sobrenadante y se resuspendieron en 50

μL de PBS 0,6X frío (4°C), para luego ser centrifugadas a 500xg durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron en 50 μL de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,1% Igepal). A la reacción de lisis se le efectuaron 10 pipeteos hacia arriba y hacia abajo y una incubación de 3 minutos en hielo. Se diluyeron 45 μL de células lisadas en 1 mL de PBS 0,6X y se centrifugaron a 500xg durante 10 minutos a 4°C. Durante la centrifugación, los restantes 5 μL de células lisadas se utilizaron para contar los núcleos después de la adición de azul de tripán. Finalizada la centrifugación, se retiró el sobrenadante y los núcleos se resuspendieron en 10 μL de PBS 0,6X. Aproximadamente 80.000-100.000 núcleos por muestra se transfirieron a tubos frescos y se centrifugaron a 500xg durante 5 minutos a 4°C. Nuevamente, los sobrenadantes se aspiraron con cuidado. Los núcleos precipitados se resuspendieron suavemente en 50 μL de reacción de transposición compuesta por 25 μL de tampón de tagmentación 2X (Illumina Cat FC-121-1030), 5 μL de transposasa Tn5 (Illumina Cat FC-121-1030) y 22,5 μL de agua destilada libre de nucleasas, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos [161]. El ADN transpuesto se purificó utilizando el kit QIAGEN MinElute (28204) y se eluyó con 10 μL de tampón de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8).

2.2.3. Amplificación y secuenciación de las librerías ATAC-seq

El ADN purificado se amplificó utilizando una mezcla de reacción que contenía 2X NEB PCR Master Mix (NEB M0541L), un partidador forward universal i5 (Ad1_noMX) y un partidador reverse indexado de la serie i7 de Nextera (Ad2.1-2.4) (Tabla 2) [161]. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 72°C durante 5 minutos, 98°C durante 30 segundos, once ciclos de 98°C durante 10 segundos, 63°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, y un paso final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se purificaron a través de perlas magnéticas AMPure (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter, A63880) para eliminar fragmentos de ADN menores a 100pb. La calidad de las librerías de ATAC-Seq se analizó por medio del Bioanalyzer TapeStation 2220 (Agilent) o mediante electroforesis en gel de agarosa. Aquellas librerías que presentaron bandas con un patrón nucleosomal se secuenciaron en un equipo Illumina NextSeq500 en la Plataforma de Transcriptómica y Genómica de Marsella-Luminy (Universidad de Aix-Marsella, TAGC), obteniéndose 50 millones de lecturas *paired-end* de 50pb por librería.

Tabla 2. Secuencias de los partidores utilizados para la amplificación de librerías ATAC-seq.

Partidores Nextera	Secuencia
Ad1_noMX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA
Ad2.1_TAAGGCGA	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.2_CGTA	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.3_AGGCAGAA	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCTGCCTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.4_TCCTGAGC	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTCAGGAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT

2.2.4. Electroforesis en geles de agarosa

Las librerías fueron visualizadas en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1x (Tris-acetato 40mM y EDTA 1mM), teñidos con bromuro de etidio 0,1µg/ml. Para cargar las muestras en los pocillos, se utilizó el buffer de carga 6X que contenía glicerol 30% y azul de bromofenol 0,5% en buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM a pH 8). Como estándar, se utilizaron 0,5 µg del marcador de peso molecular 2-Log (BioLabs) mezclado con buffer de carga 1X en un volumen total de 11 µL. Este marcador abarca tamaños de ADN que van desde 0,25 hasta 10 kb. Los productos de PCR y de digestiones fueron sometidos a un campo eléctrico de 80V por 45 minutos, sumergidos en buffer TAE1X en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN fueron visualizados mediante transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un equipo de fotodocumentación de geles (Vilber Lourmat), para la captura de imágenes.

2.3. Descarga de conjuntos de datos de ATAC-Seq de muestras humanas

Para comparar las regiones de cromatina abierta de *Xenopus tropicalis* con *Homo sapiens*, se descargaron conjuntos de datos humanos disponibles en formato FASTQ de osteoblastos (SRR12933513 y SRR12933514), hígado (SRR21927033 y SRR21927032), corazón (SRR21927531 y SRR21927534) y pulmón (SRR21927095 y SRR21927098) utilizando el navegador del European Nucleotide Archive.

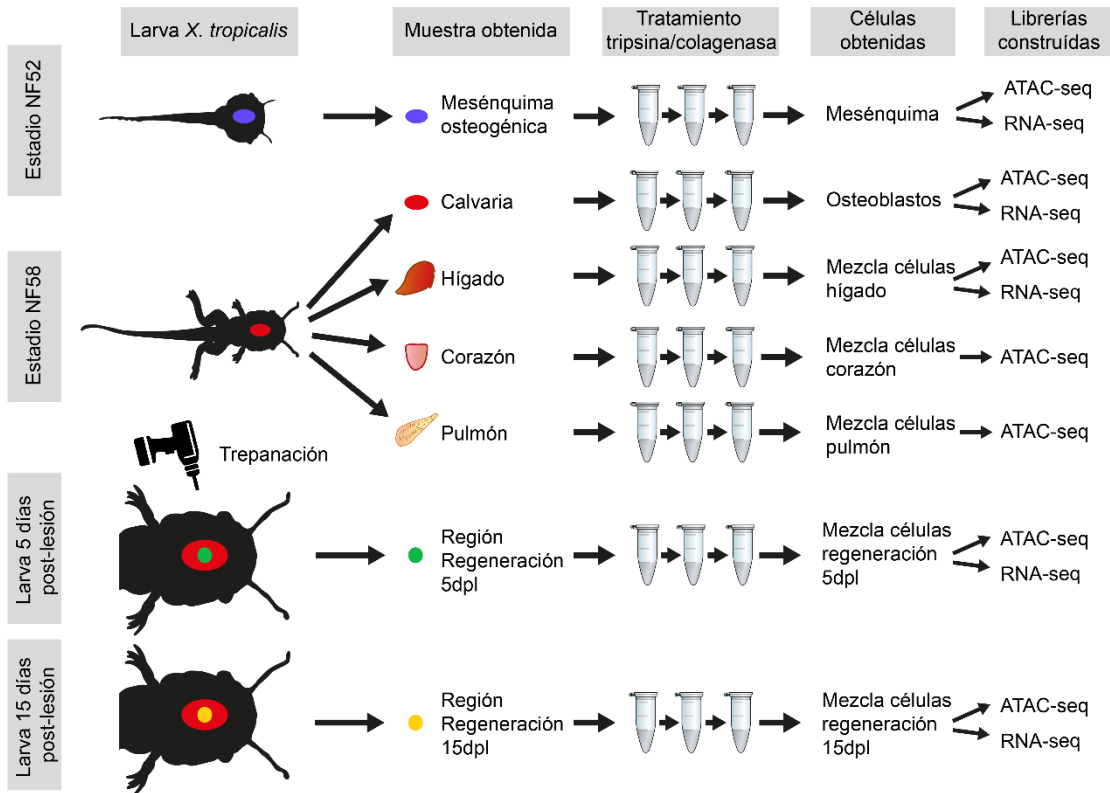


Figura 6. Obtención de muestras y construcción de librerías. Esquema que resume los tipos de tejidos utilizados para generar las distintas librerías de secuenciación masiva.

2.4. Análisis bioinformático de ATAC-Seq

2.4.1. Procesamiento de los datos de ATAC-Seq

Se analizaron los archivos de secuenciación FASTQ para evaluar la calidad, el contenido de adaptadores y las tasas de duplicación mediante *FastQC v0.11.9*. Luego, las lecturas fueron recortadas con *Cutadapt* [162] y alineadas contra el genoma xenTro9 (*Xenopus tropicalis* v9.1) o hg19 (*Homo sapiens* v19) utilizando *Bowtie2* [163] con el parámetro *--very sensitive*. Las lecturas mapeadas con una calidad inferior a 40 (MAPQ < 40) y alineadas con el genoma mitocondrial fueron filtradas con *SAMtools* [164], [165]. Se utilizó la función *MarkDuplicates* de *Picard* (Picard Tools, Broad Institute, 2018, <https://broadinstitute.github.io/picard/>) para remover lecturas duplicadas y estimar la complejidad de las librerías. Adicionalmente, se obtuvieron solo los fragmentos asociados a las regiones libres de nucleosomas (RLN), eliminando todos aquellos fragmentos con un tamaño mayor a 120 pb. La identificación de los picos (peak calling) se realizó por medio de *Genrich v0.6.1* (disponible en <https://github.com/jsh58/Genrich>) con los parámetros *-j -q 0.05*, incluyendo dos réplicas biológicas por tejido. Los picos de los tejidos se fusionaron en dos listas de picos estándar: i) osteoblastos, hígado, corazón y pulmón; y ii) mesénquima osteogénica, osteoblastos, regeneración

5dpl y regeneración 15dpl. El número de lecturas crudas mapeadas en cada pico estándar se contó utilizando la función *multicov* de *BedTools* v2.29.2 [166]. A través del paquete de *R* *edgeR* [167] los conteos crudos fueron normalizados para cada muestra aplicando el método TMM (Trimmed mean of M values) y la función *cor* de *R* se utilizó para calcular la correlación de Pearson entre las réplicas biológicas. Después del cálculo del factor de escala, se generaron perfiles de navegador genómico en formato bigwig utilizando *bamCoverage* de *deepTools* (Figura 7) [168].

2.4.2. RLN y disposición de mononucleosomas

Para inferir las posiciones de los nucleosomas para cada réplica de tejido se utilizó *NucleoATAC* con parámetros predeterminados [69]. El enriquecimiento en los SIT, la representación gráfica y los mapas de calor para visualizar los puntajes asociados con las regiones genómicas de RLN y mononucleosomas se realizaron mediante las funciones *computeMatrix*, *plotProfile* y *plotHeatmap* de *deepTools*, respectivamente.

2.4.3. Clusterización picos ATAC-Seq

Para medir cuantitativamente la ocupación relativa de cada pico, adoptamos una estrategia basada en la Entropía de Shannon, la cual permite asignar un índice de especificidad de tejido a cada elemento [66], [169], [170]. Para cada pico, definimos su accesibilidad relativa en un tipo de tejido i como $R_i = E_i/\Sigma E$, donde E_i es el valor TMM para el pico en el tejido i , y ΣE es la suma de los valores TMM en todos los tejidos. El puntaje de entropía para cada pico entre tejidos se puede definir como $H = -1 * \sum(R_i * \log_2 R_i)$. Un puntaje de entropía cercano a cero indica que la accesibilidad de este pico es altamente tejido-específica. A través de la distribución de puntajes de entropía, se definieron picos con valores inferiores a 1,5 como regiones correspondientes a los clústeres tejido-específicos, mientras que aquellos picos con valores que iban de 2 a 2,5 en más de un tejido, fueron seleccionados para formar parte de los demás clústeres.

2.4.4. Anotaciones, Enriquecimiento de TFBS y Ontología Génica

Se utilizó *HOMER* v4.11 [171] para anotar elementos genómicos como SIT y no-SIT (exónicos, TTS, intergénicos e intrónicos), determinar el enriquecimiento de sitios de unión de factores de transcripción (Transcription factor binding sites o TFBS) y calcular el %GC y %CpG de secuencias de picos tejido-específico y ubicuos. Los términos enriquecidos de Ontología Génica (Gene Ontology o GO) se identificaron con *topGO* [172] utilizando el gen más cercano a cada uno de los picos analizados. El valor p del análisis de GO se ajustó con corrección Benjamini-Hochberg (BH) y solo se graficaron los términos principales para las regiones de cromatina abierta de cada clúster.

2.4.5. Análisis de conservación

Para evaluar si las secuencias de picos específicos o clusterizados estaban conservadas en otras especies, estas regiones se sometieron a un BLAST, utilizando BLASTN (parámetros *-outfmt 6, -task blastn, -max_target_seqs 1*) contra los siguientes genomas: *Homo sapiens* (hg19), *Xenopus laevis* (XenLae10.1), *Danio rerio* (denRa11), *Gallus gallus* (galGal6), *Callorhinchus milii* (calMil1), *Petromyzon marinus* (petMar3) y *Branchiostoma floridae* (braFlo1). Los alineamientos BLASTN inferiores a 100 pb se eliminaron y solo se conservaron los alineamientos con la puntuación más alta para cada región de interés. Finalmente, se realizaron análisis de determinación de sintenia y fenotipo utilizando *GREAT v4* [173], [174].

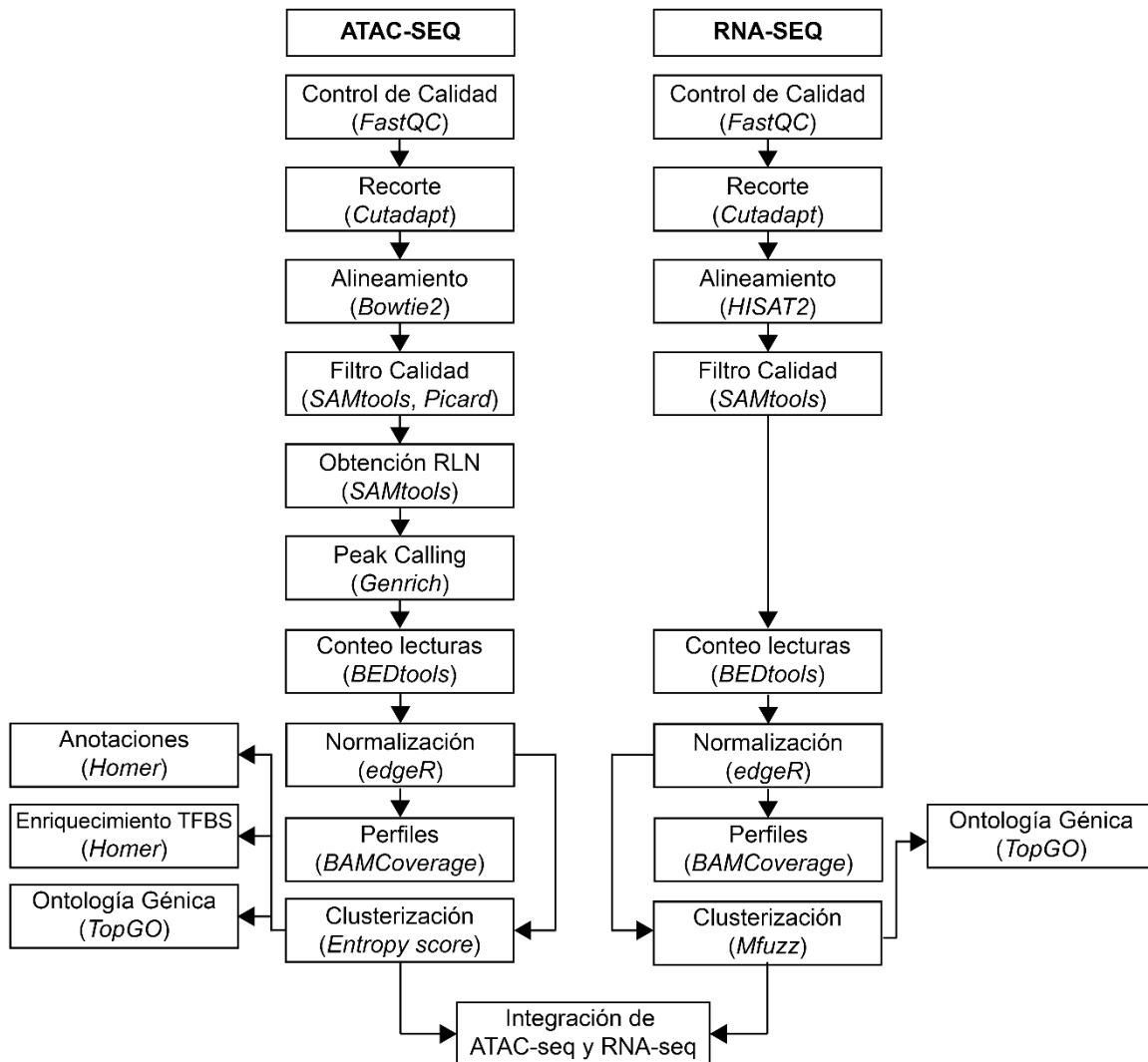


Figura 7. Flujo de trabajo bioinformático utilizado para el análisis de los datos de ATAC-seq y RNA-seq. En cursiva se denotan las herramientas utilizadas.

2.5. Análisis RNA-Seq

2.5.1. Extracción ARN total

La mesénquima osteogénica, las regiones de regeneración 5 dpl y 15 dpl y el tejido hepático, se disgregaron con un mortero plástico en TriReagent (Sigma), mientras que los osteoblastos del hueso frontoparietal se extrajeron según se describió en el punto 2.2.1, para luego ser transferidos a tubos con 1mL de TriReagent (Figura 6). Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000xg durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se trataron con 100 µL de BCP (1-bromo-3-cloropropano, Sigma), se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000xg durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo fresco, donde se le añadieron 125 µL de buffer de extracción (1M Tris, 8M LiCl, 0.5M EDTA, 10% SDS) precalentado a 56°C y 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL). Después de 30 minutos de incubación, se agregaron 250 µL de cloroformo y se mezcló vigorosamente. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 56°C y se centrifugaron a 12.000xg durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se trataron con 250 µL de solución de precipitación alta en sal (1,2 M NaCl; 0,8 M C6H5O7Na3) y 250 µL de isopropanol, y se incubaron durante la noche a -20°C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 12.000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los pellets de ARN se lavaron con 300 µL de etanol al 70%, se centrifugaron a 12.000xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se disolvieron en agua tratada con DEPC. La concentración y calidad del ARN extraído se determinaron utilizando un NanoDrop Lite (Thermo). Las librerías de RNA-Seq se construyeron en la Plataforma de Transcriptómica y Genómica de Luminy-Marsella (Universidad de Aix-Marsella, TAGC) utilizando el TruSeq mRNA Library Prep Kit v2 (Illumina; California, EE. UU.). Las librerías se secuenciaron en *paired-end* en un secuenciador Illumina NextSeq 500.

2.5.2. Procesamiento de los datos de RNA-Seq

La calidad de los archivos de secuenciación en formato FASTQ fue evaluada mediante *FastQC v0.11.9*, recortados utilizando *Cutadapt* [162] y alineados con el transcriptoma de *Xenopus tropicalis* (v9.1) utilizando *HISAT2* [175]. Las lecturas alineadas cuya calidad era inferior a 40 (MAPQ < 40) y aquellas que se alinearon al genoma mitocondrial fueron filtradas mediante *SAMtools* [164], [165]. El número de lecturas crudas alineadas a cada transcrito fue contado utilizando la función *multicov* de *BedTools v2.29.2* [166]. Se utilizó el paquete *edgeR* [167] para normalizar los conteos crudos mediante el método GeTMM [176] y la función *cor* de *R* para calcular la correlación de Pearson entre las réplicas biológicas. Después del cálculo del factor de escala, se generaron perfiles de navegador genómico en formato bigwig utilizando *bamCoverage* de *deepTools* (Figura 7) [168].

2.5.3. Clusterización datos RNA-Seq

Los datos de expresión normalizados en el punto 2.5.2 se emplearon para realizar una clusterización difusa de tipo c-media a lo largo del tiempo, utilizando un límite de membresía del clúster de 0,8 en Mfuzz [177]. Posteriormente, se llevó a cabo un filtrado manual de los clústeres de RNA-Seq, seleccionando genes con una expresión superior a 1 (\log_2+1) y un *fold change* mayor a 1,5.

2.5.3. Integración datos ATAC-seq y RNA-seq

Por medio de un script basado en el lenguaje de programación *AWK*, se realizó un cruce entre la lista de genes de cada clúster RNA-seq con la lista de elementos reguladores del clúster ATAC-seq análogo. Aquellos genes diferenciales que presentaban al menos un elemento regulador específico fueron seleccionados como genes de interés y los elementos en *-cis* cercanos catalogados como enhancers putativos.

Para la visualización del cruce de datos, se efectuó un conteo de lecturas para cada gen, utilizando una ventana de $\pm 0,5$ kb alrededor del SIT como referencia. Esto permitió crear un diagrama de dispersión, donde el eje x muestra la expresión de RNA-seq normalizada y el eje y muestra la señal ATAC-seq normalizada en el SIT para cada gen clusterizado. Para los clústeres que incluían más de una muestra (Clúster V, VI, VII), se calculó el promedio de la señal ATAC-seq de los tejidos involucrados en el clúster correspondiente para generar un valor único.

2.6. Análisis ChIP-seq

Anteriormente en el laboratorio se realizaron experimentos de ChIP-seq utilizando 5 anticuerpos distintos (H3K4me3, H3K4me1, H3K27ac, H3K27me3 y H3 total) y efectuando una secuenciación en *single-end*. La calidad de los archivos de secuenciación en formato FASTQ fue evaluada mediante *FastQC v0.11.9*, recortados utilizando *Cutadapt* [162] y alineados con el genoma xenTro9 (*Xenopus tropicalis* v9.1) mediante *Bowtie2* [163] con el parámetro *--very sensitive*. Las lecturas alineadas cuya calidad era inferior a 40 (MAPQ < 40) y aquellas que se alinearon al genoma mitocondrial fueron filtradas mediante *SAMtools* [164], [165]. Se identificaron los centros de los picos ATAC-seq seleccionados de la lista estándar que incluía datos de osteoblastos, hígado, corazón y pulmón. Luego, se generó una ventana de ± 1 kb alrededor de estos centros y se utilizaron estas coordenadas para contar las lecturas de ChIP-seq por medio de la función *multicov* de *BedTools v2.29.2* [166]. La normalización de los conteos crudos se realizó de manera manual dividiendo los valores de cada pico por el valor de H3 total. Se generaron perfiles de navegador genómico en formato bigwig utilizando *bamCoverage* de *deepTools*, aplicando un valor único para el parámetro *--scale factor* [168].

2.7. Gráficos y análisis estadístico

Se utilizó el entorno *R* para generar todos los gráficos de este trabajo. Los diagramas de caja con la función *boxplot*, los diagramas de dispersión, los gráficos de puntos y de burbujas con la función *ggplot*, y los mapas de calor que denotan la expresión de RNA-seq con la función *heatmap*. Los análisis estadísticos también fueron realizados en *R*, utilizando la prueba estadística paramétrica *t* de Student o la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y una corrección de *p* de Bonferroni dependiendo el caso.

2.8. Histoquímica e inmunofluorescencia

2.8.1. Tinción Alizarin Red y Calceín Green

Para la marcación in vivo del hueso en *Xenopus*, se preparó una solución de Alizarin Red disuelta en un tampón MMR 1X, alcanzando una concentración final del 0,1%. Esta solución se diluyó 10 veces en pequeños recipientes, cada uno conteniendo un máximo de 2 larvas NF58 nadando libremente en 40 mL de solución. Después de una incubación de 2 horas, los renacuajos se anestesiaron con tricáina y se les provocó una lesión craneal. Los individuos operados fueron transferidos a acuarios y mantenidos durante 5 o 15 días (dpi). Posteriormente, las larvas fueron tratadas con un 0,005% de Calcein Green durante 30 minutos. Las calvarias se disecaron y se capturaron imágenes de las señales fluorescentes de Alizarin Red y Calcein Green utilizando un microscopio de zoom macro MVX10 (Olympus) con los filtros mCherry y GFP, respectivamente [149].

2.8.2. Inmunofluorescencia de montaje completo

Se disecaron calvarias en proceso de regeneración a 5 y 15 dpi, y se fijaron en PFA al 4% a 4°C durante toda la noche. Después, se procedió a lavarlas tres veces con PBS 0,6X durante 5 minutos, en agitación suave a temperatura ambiente. Las calvarias fijadas fueron incubadas en glicina 0,15 M en PBS 1X durante 30 minutos y se permeabilizaron mediante lavados con PBST (PBS 1X/Tritón X-100 al 0,5% (v/v)) durante 15 minutos, repitiendo este proceso ocho veces. Luego de la permeabilización, las calvarias se bloquearon con PBST-BSA al 4% (p/v) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti-pH3 (Ser10) (Cell signaling technology) (1:300) en PBST-BSA al 4% (p/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación durante toda la noche a 4°C. Los tejidos fueron sometidos a un lavado con PBST durante 2 horas, cambiando la solución ocho veces, para luego ser incubados con el anticuerpo secundario Alexa 480 anti-rabbit fab2 (Cell signaling technology) (1:500) y DAPI (1:1000) en PBST-BSA al 4% (p/v) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se repitió el lavado con PBST durante 2 horas, cambiando la solución ocho veces. Se efectuó un último lavado con PBS 1X durante 30 minutos. Para concluir, las calvarias fueron montadas entre dos cubreobjetos en medio de montaje para fluorescencia, asegurando los bordes de los cubreobjetos con cianoacrilato.

2.9. Histología de hueso en proceso de regeneración

2.9.1. Cortes histológicos en criostato

Se diseccionaron calvarias en proceso de regeneración 5 y 15 dpl y se fijaron en PFA 4% a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se les realizaron 3 lavados con PBS 0,6X para remover los residuos de fijador y se descalcificaron en solución MORSE (citrato de sodio 10% y ácido fórmico 20%) por 3 horas. Las calvarias descalcificadas se embebieron en OCT y se congelaron en isopentano preenfriado en nitrógeno líquido (aproximadamente a -150°C). Antes de realizar los cortes, las calvarias se aclimataron durante 20 minutos dentro de la cámara del criostato a -20°C, para luego obtener criosecciones longitudinales de 12 µm de espesor, las cuales se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

2.9.2. Tinción Hematoxilina-Eosina

Con el objetivo de examinar la estructura general de la región de regeneración a distintos días y evaluar la calidad de las secciones, se efectuaron tinciones de hematoxilina y eosina (H-E). Los cortes obtenidos en el punto 2.8.1 fueron sometidos a una incubación de 20 segundos en hematoxilina, seguida de lavados en agua destilada y un azulado en agua corriente tibia. A continuación, los cortes se incubaron durante 10 segundos en eosina, seguido de lavados adicionales con agua corriente y destilada. Tras esto, las muestras se deshidrataron en alcohol al 100% durante 3 minutos y se aclararon con Histoclear I y II durante 3 minutos y 5 minutos, respectivamente. Finalmente, las muestras fueron montadas utilizando el medio de montaje histológico Entellan.

2.10. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

2.10.1. Generación de ADNc mediante RT-PCR

A partir de osteoblastos de calvaria, se obtuvo ARN total mediante extracción con TriReagent, siguiendo el mismo protocolo descrito en el punto 2.5.1. Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo en un volumen total de 20 µl, utilizando 1 µg de ARN, 5 µM de oligo-dT, 0,5 µM de dNTPs, 0,5 µl de RNAsin (Promega) y 0,8 µL de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA), según las indicaciones del fabricante. El cDNA resultante fue cuantificado utilizando el equipo NanoDrop Lite (Thermo) y almacenado a -80°C para su posterior uso en la amplificación por PCR.

2.10.2. Amplificación de ADNc mediante PCR de alta fidelidad

Se utilizaron 0,5 µL de ADNc de osteoblastos por reacción de PCR para generar fragmentos de ADN con extremos romos. Esto se consiguió por medio de amplificación con la polimerasa de alta-fidelidad KOD (Calbiochem, San Diego, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tres fragmentos de ADN fueron amplificados utilizando los siguientes partidores: *dlx5*-forward: AAA AAA TGA CAG GAG TCT ATG AGC G y *dlx5*-reverse: CCG TAG AGA GTC CCT GAT GCC A (874 pb); *sparc*-forward: AGG TCC GAC TTC AGA ATG AG y *sparc*-reverse: TCT AAG TTA GCA CCT TTG CTG (1045 pb); *col1a1*-forward: GGC ACC CAT GGA TAT CGG AG y *col1a1*-reverse: CGC TGT CAA CTT TTG GGT CG (1197 pb). Seguidamente, los amplicones fueron purificados mediante el kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega, Madison, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, el ADN purificado fue cuantificado utilizando el equipo NanoDrop Lite (Thermo) y almacenado a -80°C para su posterior uso.

2.11. Clonación molecular

2.11.1. Clonación mediante ligación

El plásmido pBluescript (pBS) fue linearizado con la enzima de restricción EcoRV y utilizado como vector para la ligación de los amplicones de *dlx5*, *col1a1* y *sparc* de *Xt*. La ligación fue realizada mediante ADN ligasa T4 (New England Biolabs, County Road, Ipswich, USA), en un volumen total de 10 µL que incluía 100 ng de inserto y 30 ng de vector. A continuación, la reacción de ligación fue incubada a 16°C durante toda la noche. Al día siguiente, se procedió a inactivar la ligasa T4 incubando a -80°C por 5 minutos.

2.11.2. Transformación bacteriana por golpe térmico

Se tomaron 5 µL de las reacciones de ligación y se incubaron en 50 µL de bacterias DH5α calcio-competentes por 10 minutos en hielo. Posteriormente, las bacterias se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 30 segundos, seguido de una incubación adicional en hielo durante 2 minutos. Luego, se añadieron 100 µL de medio SOC y se incubaron durante 45 minutos a 37°C con agitación suave. Se sembraron 100 µL del inóculo en placas LB/Agar que contenían 100 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de X-gal. Para finalizar, las placas portadoras de las bacterias transformadas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

2.11.3. Selección de colonias y PCR colonia

Las colonias bacterianas de color blanco, obtenidas en el punto 2.10.2, se sometieron a análisis mediante PCR de colonia. Se utilizó la polimerasa Go-Taq Green (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante, junto con partidores específicos para detectar la presencia del inserto en el vector y su orientación respecto a los promotores T3 o T7. La confirmación de la obtención del plásmido deseado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, aplicando un campo

eléctrico de 90V durante 35 minutos. Posteriormente, las colonias que mostraron el plásmido esperado se cultivaron en 5 mL de medio LB líquido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, y se incubaron a 37°C con una agitación de 200 rpm durante toda la noche.

2.11.4. Purificación de plásmidos

Para el análisis de rutina, los plásmidos se purificaron utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega, Madison, USA), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Posteriormente, se sometieron a ensayos de enzimas de restricción para su caracterización (punto 2.10.5). Una vez confirmada la identidad de los plásmidos, se inoculó un volumen de 100 µL de las bacterias positivas en 100 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante 20 horas. Finalmente, los plásmidos se extrajeron utilizando el kit PureYield Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, USA), se cuantificaron mediante NanoDrop Lite (Thermo) y se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

2.11.5. Digestiones analíticas mediante enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se efectuaron utilizando 200 ng de ADN en una solución de buffer para enzimas de restricción 1x, BSA 1x y 2 UI de enzimas en un volumen total de 10 µl por reacción. Estas digestiones se incubaron según las instrucciones del fabricante, con un tiempo mínimo de 60 minutos, y visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, aplicando un campo eléctrico de 80V durante 45 minutos

2.12. Reacción de Transcripción con UTP-DIG

2.12.1. Linearización de Plásmidos

Los plásmidos pBS fueron linearizados mediante una reacción de restricción. Para ello, se utilizaron 10 UI de enzima y 10 µg de ADN en una reacción de 50 µL, la cual se incubó a 37°C durante toda la noche. Una vez que se logró la linearización, se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5,5 y el doble de volumen de etanol al 100%. Posteriormente, la muestra se mezcló y se precipitó mediante una incubación a -20°C durante toda la noche. El ADN se centrifugó a 14.000g durante 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet suavemente con 0,3 mL de etanol al 70%. La muestra se centrifugó nuevamente a 14.000g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se secaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una vez que el pellet de ADN estuvo seco, se resuspendió en 10 µL de agua DEPC y se almacenó a -80°C para su uso posterior en la reacción de transcripción.

2.12.2. Reacción de Transcripción y Purificación de Sondas ARN-Dig Mediante Precipitación con LiCl₂

Los plásmidos pBS linearizados se utilizaron como molde para sintetizar sondas de ARN-Dig en sentido y antisentido. La reacción de transcripción se llevó a cabo utilizando la polimerasa de ARN T3 o T7, dependiendo del sentido de síntesis, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se añadieron 6 µL de agua DEPC, 2 µL de DNAsa I (Roche) y 2 µL de buffer de DNAsa I (Roche), y se incubó a 37°C durante 90 minutos para eliminar el ADN residual. Las sondas de ARN-Dig obtenidas se precipitaron agregando 1 µL de EDTA 0,5M y 2,5 µL de LiCl 4M, mezclando y añadiendo 75 µL de etanol al 100% frío. Se dejaron toda la noche a -20°C. El precipitado se centrifugó a 14.000g durante 20 minutos a 4°C. Luego, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 300 µL de etanol al 70% frío. Se repitió la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez seco el pellet, se resuspendió en 15 µL de agua DEPC y se cuantificó mediante el kit Qubit Broad Range RNA Assay (Thermo Fisher). Se utilizaron 100 ng de ARN-Dig para la electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar su estabilidad estructural. Finalmente, las sondas ARN-Dig se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

2.13. Hibridación *in situ*

2.13.1. Inclusión en parafina de calvarias en proceso de regeneración de *Xenopus tropicalis*

Se disecaron calvarias en proceso de regeneración a 15 días post lesión (dpl) y se fijaron en PFA al 4% a 4°C durante toda la noche. Luego, se realizaron tres lavados con PBS 0,6X durante 5 minutos, con agitación suave a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras de calvaria fijadas se descalcificaron durante 3 horas en solución MORSE (10% de citrato de sodio y 20% de ácido fórmico) con agitación suave. Las calvarias descalcificadas se incluyeron en parafina y se seccionaron en cortes de 7 µm utilizando el micrótopo Microm HM 325 (Thermo Scientific). Estos cortes se montaron en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher, Pittsburgh, PA, USA) y se incubaron a 60°C durante toda la noche.

2.13.2. HIS en cortes de calvarias en proceso de regeneración de *Xenopus tropicalis*

Durante el primer día, las muestras fueron desparafinadas mediante dos lavados con xilol. Luego, se procedió a su hidratación gradual en soluciones de etanol decrecientes (100% etanol, 95% etanol/5% PBS, 75% etanol/25% PBS, 50% etanol/50% PBS, 25% etanol/75% PBS y finalmente PBS al 100%). Posteriormente, las muestras fueron tratadas con Proteinasa K (10 µg/ml) a 37°C durante 30 minutos para facilitar la penetración de las sondas ARN-Dig. Es importante destacar que este paso requiere de optimización, ya que un tratamiento insuficiente dificulta la entrada de las sondas en el ARN diana, mientras que un tratamiento excesivo puede provocar la degradación

histológica de los tejidos durante los lavados posteriores. Seguidamente, los tejidos fueron tratados con Trietanolamina (0,1M, pH 8) y anhídrido acético al 0,25% para evitar la unión de las sondas ARN-Dig en los portaobjetos y/o tejidos. Las muestras fueron preincubadas durante 3 horas en una solución de hibridación (Formamida al 50%, 0,4 g de Roche blocking reagent, SSC 5x, torula de ARN a 1mg/mL, Heparina a 100 µg/mL, Tween 20 al 1%, CHAPS al 0,1%, EDTA a 10mM pH 8). A continuación, esta solución fue reemplazada por una nueva solución de hibridación que contenía 1 ng/µL de sonda ARN-Dig, y se incubó a 60°C durante toda la noche. Las muestras se mantuvieron dentro de una cámara húmeda y oscura para prevenir la evaporación.

En el segundo día, los portaobjetos fueron sumergidos en SSC 4X con CHAPS al 0,1% a 60°C, seguido de lavados en SSC 2X con CHAPS al 0,1% y Formamida al 50% durante 30 minutos a 60°C. Posteriormente, se lavaron en solución TNE (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM) y se trataron con RNAasa A (20 µg/mL) durante 30 minutos a 37°C para eliminar el exceso de sondas ARN-Dig no hibridadas. Se realizaron lavados adicionales en SSC 0,2X con CHAPS al 0,1% y Buffer 1 (Tris pH 7,5 100 mM, NaCl 150 mM) para estabilizar el híbrido RNA-RNA. Las muestras fueron bloqueadas con Buffer 1 suplementado con suero de cabra al 20% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se añadió anticuerpo anti-DIG-AP (Roche) a una dilución de 1:2000 en Buffer 1 suplementado con suero de cabra al 20%, y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche dentro de la cámara húmeda.

En el tercer día, después de los lavados con Buffer 1 con Tween al 0,05% para eliminar el exceso de anticuerpo, las muestras fueron sumergidas dos veces en una solución de fosfatasa alcalina (Tris 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tween 0,1%). Luego, se procedió a la incubación en una solución colorante saturada de NBT/BCIP a 25°C. La duración de esta reacción varió dependiendo de la abundancia de ARN blanco, oscilando entre 30 minutos y 48 horas. Cuando fue necesario, la reacción se detuvo mediante lavados con PBS. Seguidamente, las muestras fueron fijadas en MEMFA (MOPS 100 mM, EGTA 2 mM, MgSO₄ 1 mM, formaldehído al 3.7%) durante 1 hora a temperatura ambiente para inactivar la fosfatasa alcalina. Después, se procedió a la deshidratación progresiva en soluciones crecientes de etanol (25%, 50%, 75% y dos lavados en etanol al 100%) durante 5 minutos cada uno. Por último, las muestras fueron lavadas cuatro veces con xilol durante 5 minutos y montadas con Entellan (Merck).

2.14. Western blot

2.14.1. Extracción de proteínas totales

Se disecaron ocho calvarias en proceso de regeneración 5dpl. A partir de estas, se extrajo exclusivamente el tejido en regeneración y el hueso adyacente a la zona lesionada. Ambos tipos de muestras se colocaron en hielo y se lavaron tres veces con PBS frío. Luego, se trataron durante 24 horas en un buffer de lisis frío (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1mM PMSF) con

agitación vertical a 4°C. Después, se centrifugaron a 12.000g durante 20 minutos a 4°C, extrayendo y guardando el sobrenadante para análisis posteriores.

2.14.2. Western blot de muestras óseas de *Xenopus tropicalis*

A partir de las muestras de proteínas, se mezclaron 20 µg de proteínas con tampón de carga de proteínas, se calentaron a 95°C por 15 minutos y posteriormente fueron cargadas y separadas mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%. Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a membranas de PVDF utilizando corriente eléctrica con amperaje constante de 28 mA por 18 horas. Para bloquear los sitios de unión inespecíficos en la membrana, se empleó una solución de leche al 5% p/v en tampón TBS y Tween-20 al 0,1% v/v, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas bloqueadas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-sox2 (1:500) (Cell signaling technology) diluido en TBS-Tween 0,1% v/v por toda la noche a 4°C en agitación. Luego de 3 lavados de 15 minutos en agitación con TBS-Tween 0,1% v/v, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario Peroxidase AffiniPure™ Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:500) por 2,5 horas a temperatura ambiente en agitación. Tras realizar 3 lavados de 15 minutos en agitación con TBS-Tween 0,1% v/v, las membranas fueron reveladas empleando el kit de revelado cytiva amersham RPN2209 ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bandas respectivas fueron detectadas a través del equipo de revelado iBright 750 (Invitrogen) con la exposición sugerida automáticamente por el equipo.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización del paisaje regulatorio de osteoblastos durante el desarrollo

3.1.1. Identificación de regiones de cromatina abierta de osteoblastos, hígado, corazón y pulmón
Para explorar el paisaje regulatorio durante el desarrollo del hueso craneal en *Xenopus tropicalis* (*Xt*), nos enfocamos en el análisis de osteoblastos primarios, obtenidos mediante el protocolo establecido por Bertin et al. [160]. Es crucial destacar que este procedimiento de extracción excluye osteocitos embebidos en la matriz ósea [110], permitiéndonos estudiar exclusivamente los osteoblastos. Como grupo de comparación, incluimos tejidos de hígado, corazón y pulmón de larvas en estadio NF58, seleccionados estratégicamente bajo el criterio de que carecen de mineralización y no están vinculados a tejidos esqueléticos, lo que garantizó que no interfirieran con la identificación de genes y reguladores osteogénicos (Figura 8).

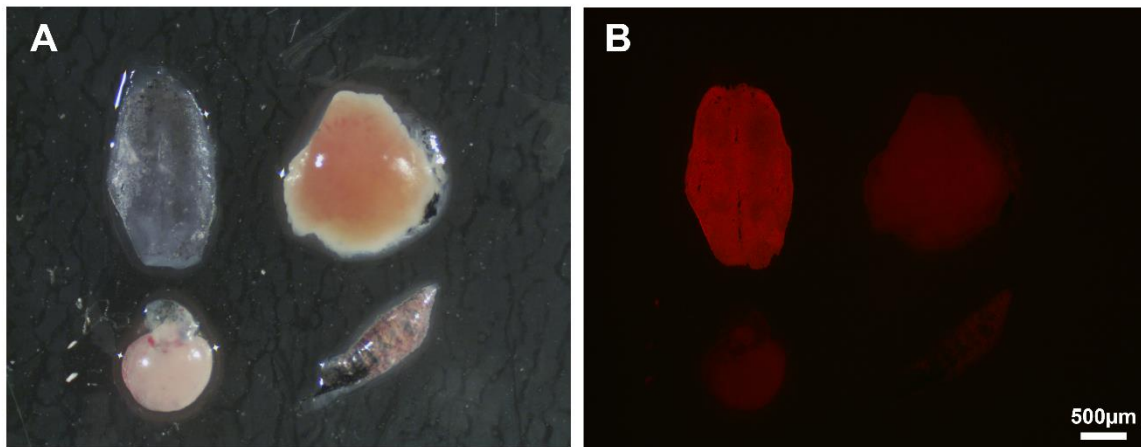


Figura 8. Comprobación de la ausencia de mineral en los tejidos control. Imágenes adquiridas bajo lupa de fluorescencia de hueso frontoparietal, hígado, corazón y pulmón luego de ser tratadas con Alizarin Red. La observación se efectuó utilizando el campo claro **(A)** y el filtro de fluorescencia roja **(B)**.

Experimentos de ATAC-seq fueron realizados en duplicados sobre núcleos aislados desde osteoblastos, hígado, corazón y pulmón. Como paso inicial fue necesario validar y verificar la calidad de los datos obtenidos. Sobre esto, observamos que tanto las librerías (antes de la secuenciación) como el alineamiento contra el genoma (después de la secuenciación), exhibieron el clásico patrón de distribución de tamaños de fragmentos de esta técnica, evidenciando picos discretos correspondientes a las fracciones de RLN, mononucleosomas y dinucleosomas (Figura 9A). En el caso de la librería antes de la secuenciación, observamos una ausencia de señal en el carril correspondiente al control negativo, además de bandas asociadas a un trinucleosoma (Figura 9A,

recuadro). Al enfocarnos en los SIT anotados en *Xt*, identificamos que las señales de ATAC-Seq de las RLN y mononucleosomas forman dos grupos distintos. El primer grupo consiste en 5.949 promotores que presentan una RLN robusta ubicada inmediatamente corriente arriba del SIT y flanqueada por dos nucleosomas bien posicionados (Figura 9B, panel izquierdo), posiblemente asociados a genes expresados. En contraste, el segundo grupo engloba 16.947 promotores con señales débiles de RLN y mononucleosomas (Figura 9B, panel derecho), sugiriendo un enriquecimiento de genes transcripcionalmente reprimidos, expresados a bajos niveles, o posiblemente, con su SIT anotado erróneamente en el genoma de referencia. Se observaron situaciones similares en los tejidos de hígado, corazón y pulmón (Anexo 1). Después de realizar la identificación de picos mediante la señal de RLN, se consolidaron los picos de los cuatro tejidos en una lista estándar. Se cuantificó el número de lecturas crudas asignadas a cada pico estándar y se calcularon las correlaciones de Pearson, evidenciando una alta similitud entre las dos réplicas de cada muestra (Figura 9C).

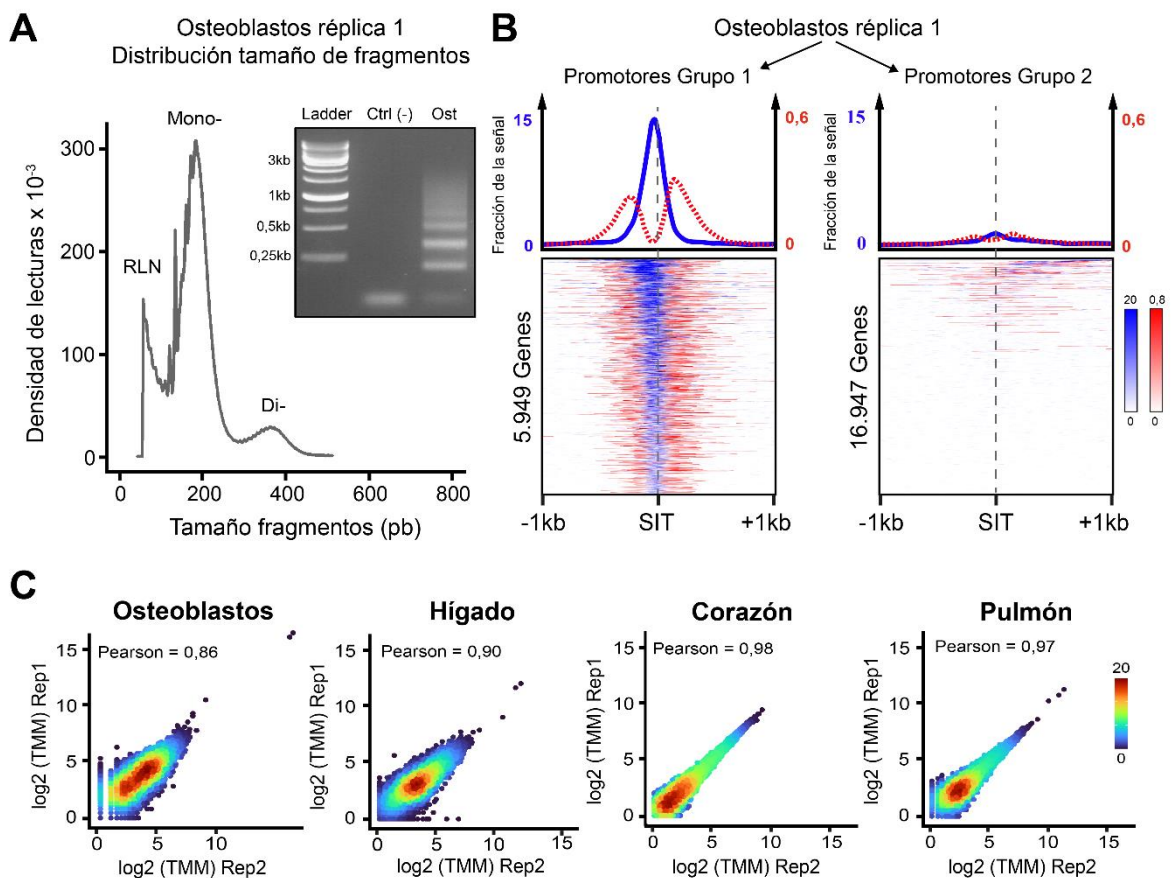


Figura 9. Validación de las librerías de ATAC-Seq. **(A)** Distribución del tamaño de fragmentos después y antes de la secuenciación (recuadro) para la primera réplica de osteoblastos. Se indican las fracciones correspondientes a regiones libres de nucleosomas (RLN), mononucleosomas (Mono-

) y dinucleosomas (Di-). **(B)** Las señales de RLN (azul) y mononucleosomas (rojo) en los SIT (sitios de inicio de la transcripción) anotados en el genoma de Xt se visualizan y agrupan de forma separada, identificando un conjunto de 5.949 SIT que albergan un claro RLN flanqueado por dos nucleosomas bien posicionados (izquierda), y otro conjunto de 16.947 SIT que carecen de un RLN y exhiben una señal de mononucleosoma difusa (derecha). **(C)** Correlación de la señal de RLN para ambas réplicas de cada muestra analizada. Se presentan los valores de correlación de Pearson.

Al examinar la distribución genómica de los picos identificados, observamos que las RLN situadas fuera de los SIT, ya fueran regiones intergénicas, intrónicas, exónicas o sitios de término de la transcripción (STT), constituían entre el 61% y el 74% de la totalidad de los picos en cada muestra (Figura 10A). A este grupo de regiones distales las denominamos "picos no-SIT", ya que estas podrían representar cualquier tipo de elemento *cis*-regulatorio, incluyendo enhancers, silenciadores e insuladores.

En términos generales, el coeficiente de correlación de Pearson fue considerablemente más elevado para los picos SIT que para los picos no-SIT (Figura 10B). El análisis jerárquico evidenció que las RLN de corazón y pulmón comparten un perfil más similar entre sí en comparación con los osteoblastos o el hígado, tanto en las regiones SIT como en las no-SIT (Figura 10B). En contraste, la distribución global de las regiones SIT y no-SIT de osteoblastos resultó ser la más diferente entre las 4 muestras analizadas (Figura 10B), lo cual refleja su singularidad como el único tejido capaz de mineralizar su matriz extracelular dentro de este análisis.

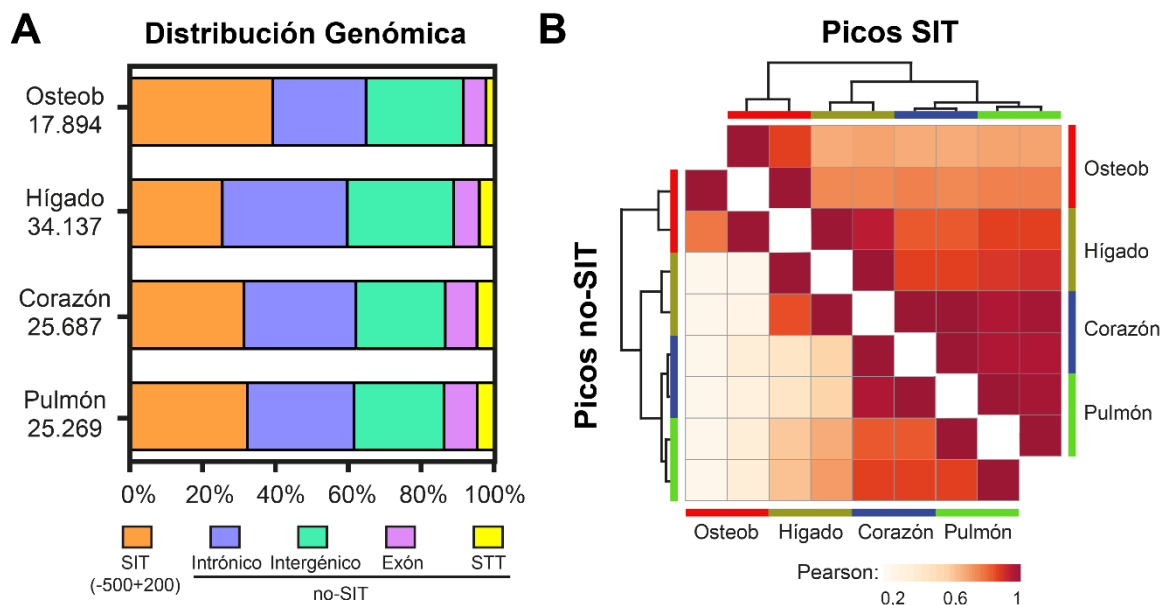


Figura 10. Caracterización de los picos de ATAC-Seq. **(A)** Anotación genómica de los picos identificados. Para cada muestra, se indica el número de picos validados por el puntaje de reproducibilidad (IDR). **(B)** Mapa de calor que representa el coeficiente de correlación de Pearson y

la agrupación jerárquica de todos los picos de ATAC-Seq identificados en cada muestra, anotados como SIT o no-SIT en el genoma de *Xt*.

3.1.2. Clasificación de regiones libres de nucleosomas tejido-específicas y ubicuas.

Consideramos que al sustraer las RLN osteoblásticas con los datos de hígado, corazón y pulmón, se alcanzaría un enriquecimiento sustancial en RLN específicas, estrechamente vinculadas con la activación de genes relacionados con la osteogénesis y la producción de la matriz ósea. Con este propósito, llevamos a cabo una clusterización de todos los picos de las cuatro muestras, identificando picos tejido-específicos y ubicuos, tanto en secuencias SIT como en no-SIT (Figura 11A). Cabe aclarar que se denominaron ubicuos todos aquellos picos que se encontraban en las cuatro muestras analizadas. La marcada correlación entre las señales de RLN y mononucleosomas alrededor de los picos SIT y no-SIT sugiere que las regiones de cromatina abierta están consistentemente flanqueadas por dos nucleosomas laterales bien posicionados (Figura 12). Posteriormente, examinamos la posición de las RLN no-SIT en relación con el gen anotado más cercano, revelando que los picos tejido-específicos tienden a ubicarse más distalmente que los picos ubicuos, cuya distribución se asemeja al patrón observado al considerar todos los picos de cada muestra (Figura 11B). Los análisis de Ontología Génica (GO) de los genes cuyos promotores están más próximos a los picos no-SIT identificados, revelaron procesos biológicos y funciones moleculares altamente congruentes con cada categoría de picos tejido-específicos o ubicuos (Figura 11C). Por consiguiente, las regiones específicas de osteoblastos muestran una enriquecida presencia de genes esqueléticos involucrados en la deposición de la matriz de colágeno, la diferenciación de osteoblastos, así como las vías de señalización mediadas por TGF- β e integrina, conocidas por controlar positivamente la osteogénesis [178], [179], [180]. En contraposición, las regiones específicas del hígado se asocian con genes relacionados con el sistema inmunológico y la biología de los macrófagos, mientras que las regiones específicas del corazón están vinculadas con eritrocitos y vasos sanguíneos, y en menor medida, con fibroblastos y cardioblastos (Figura 11C). Estos resultados sugieren que nuestro procedimiento de disociación de tejidos enriqueció las muestras de hígado y corazón en glóbulos blancos y rojos, respectivamente, lo cual concuerda con el hecho de que el hígado larval es un sitio importante de mielopoiesis en *Xenopus* [181]. Por último, los picos no-SIT ubicuos se encuentran cerca de genes implicados en procesos fundamentales de biología celular, incluyendo la transcripción, el ciclo celular, la organización de la cromatina y el transporte de vesículas (Figura 11C). Dado el escaso número de regiones, no se obtuvieron resultados significativos con picos de ATAC-Seq no-SIT específicos del pulmón, ni con cualquier categoría de SIT (datos no mostrados). Para ilustrar que nuestro procedimiento identifica picos específicos de osteoblastos, la Figura 11D muestra perfiles de la señal de RLN en loci de genes conocidos por su participación en el desarrollo y la evolución ósea, como *runx2*, *sparc*, *panx3* y *fam20c* [182], [183], [184], [185]. Nuestro enfoque también revela la presencia de picos específicos

del tejido para el hígado (locus *spi1*, implicado en hematopoyesis [186]), corazón (locus *sptb*, implicado en eritropoyesis [187]) y pulmón (locus *pax6*, implicado en la pluripotencia [188]), así como picos ubicuos que muestran RLN en todos los tejidos (locus *actb*, codificante de la actina beta citoesquelética). Concluimos que nuestro método sustractivo permitió la identificación precisa de regiones de cromatina abierta específicas de osteoblastos en *Xt*.

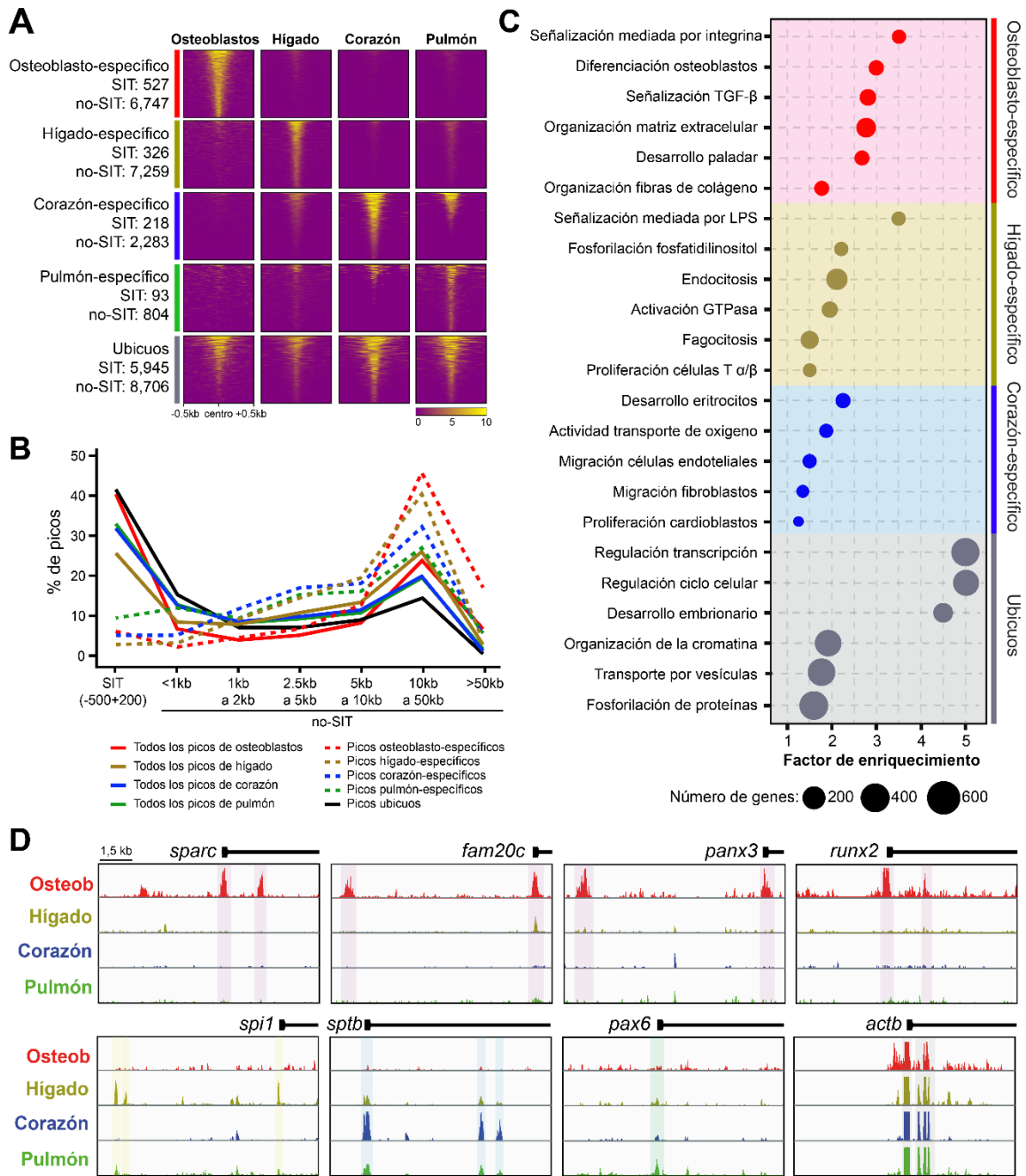


Figura 11. Identificación de regiones de cromatina abierta tejido-específicas. **(A)** El análisis de clusterización de la intensidad de la señal de los picos de ATAC-Seq, revela la presencia de picos

tejido-específicos y ubicuos. **(B)** Distribución de distancias con respecto a los sitios de inicio de la transcripción (SIT) anotados para *Xt*, discriminando entre picos tejido-específicos y ubicuos. **(C)** Se exhiben los términos de ontología génica correspondientes a regiones de cromatina abierta específicas de osteoblastos, hígado, corazón y ubicuas. Se seleccionaron genes cuyos promotores están más cercanos a los picos identificados de ATAC-Seq para el análisis de ontología génica. En cada término, los gráficos muestran el número de genes asociados (tamaño del círculo) y el factor de enriquecimiento (eje x). Perfiles ilustrativos de loci genómicos que exhiben picos de ATAC-Seq específicos para osteoblastos (*sparc*, *fam20c*, *panx3*, *runx2*), hígado (*spi1*), corazón (*sptb*), pulmón (*pax6*) o picos ubicuos (*actb*). Las unidades de transcripción se indican con líneas horizontales y los SIT con vectores negros. El sombreado de fondo indica regiones de cromatina abierta que muestran un enriquecimiento significativo validado por la identificación de picos.

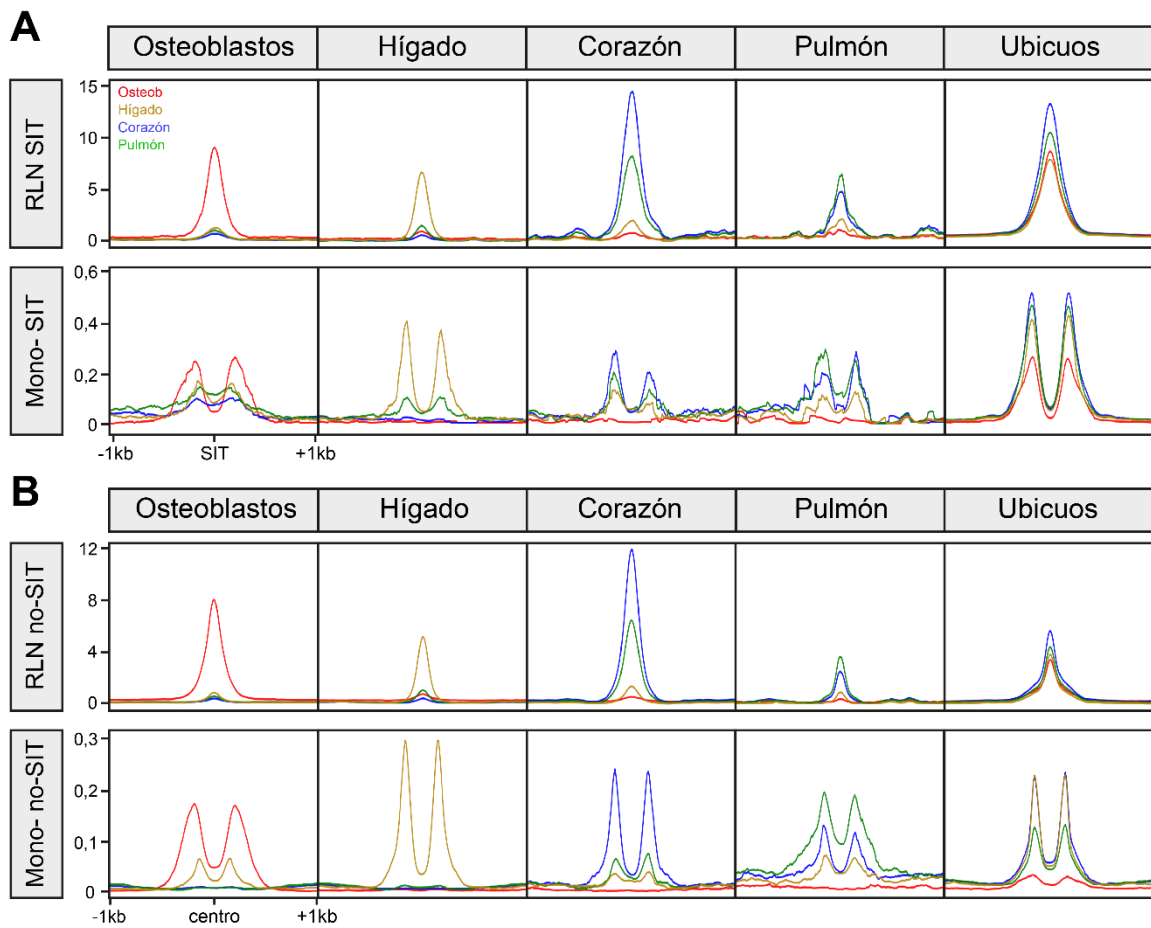


Figura 12. Comparación de las señales de ATAC-Seq en ventanas de 2 kb para las regiones libres de nucleosomas (RLN) y mononucleosomas (Mono-) en los sitios de inicio de la transcripción (SIT) **(A)** y en las regiones no-SIT **(B)**, tanto para picos tejido-específicos como ubicuos.

3.1.3. Características de secuencia de las regiones de cromatina abierta tejido-específicas y ubicuas en *Xenopus tropicalis*

Para obtener una comprensión más profunda de la naturaleza de las regiones de cromatina abierta identificadas, dirigimos nuestro análisis hacia sus características de secuencia subyacentes. En primer lugar, investigamos el contenido de CpG, dado que este dinucleótido se ha asociado con promotores y enhancers [15], [189]. Observamos que todos los tipos de SIT y no-SIT exhiben un enriquecimiento central de CpG (Figura 13A). Específicamente, las RLN ubicuas y específicas del pulmón muestran el enriquecimiento más pronunciado de CpG en picos SIT (alrededor del 5% de CpG) y no-SIT (alrededor del 2,5% de CpG) (Figura 13A). Por otro lado, el enriquecimiento de CpG es más débil en los SIT específicos del hígado, así como en los no-SIT específicos del corazón y del hígado, donde el nivel más alto en la frecuencia de CpG apenas alcanzó niveles aleatorios y se debió principalmente a una depleción lateral en este dinucleótido (indicado con asteriscos en la Figura 13A). Luego, examinamos por separado la frecuencia de los nucleótidos C y G, encontrando que el enriquecimiento siempre es mayor en los SIT que en los no-SIT (Figura 13B). Además, nuestro análisis reveló una frecuencia más alta de los nucleótidos C y G para las RLN ubicuas y específicas del pulmón, tanto en SIT (alrededor del 30%) como en no-SIT (alrededor del 26%) (Figura 13B). Observamos un marcado fenómeno de sesgo-GC solo en los SIT ubicuos, y, en menor medida, en el tejido pulmonar, como se señala con las flechas en la Figura 13B. También se evidencia una depleción lateral en la frecuencia de C y G para las RLN no-SIT específicas de osteoblastos, corazón e hígado (marcadas con asteriscos en la Figura 13B). Aunque la razón de esta depleción lateral en C, G y CpG no está clara, es relevante destacar que la unión del factor de transcripción CEBPA está relacionada con un patrón de CpG similar en los genomas de macacos y perros [190].

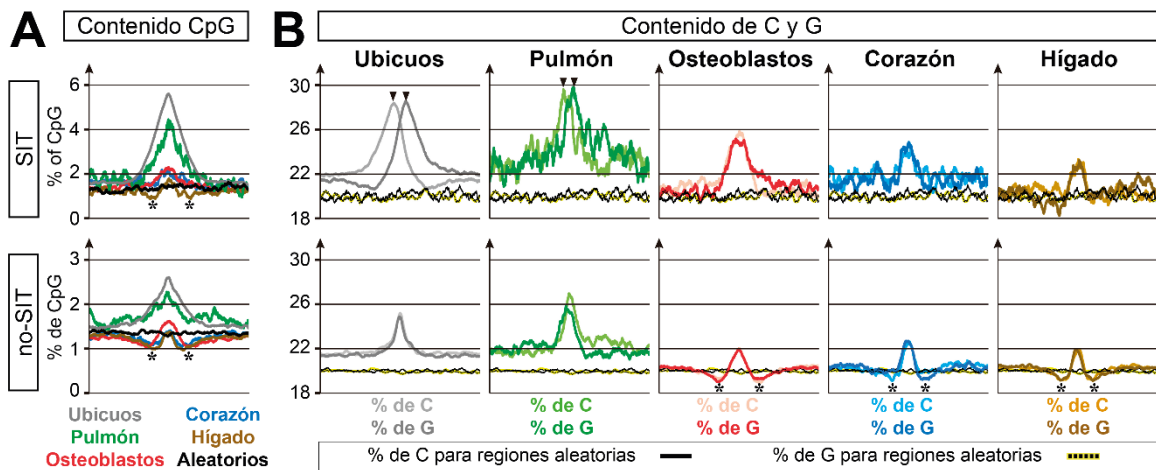


Figura 13. Características de las secuencias de los picos SIT y no-SIT. Se presenta el porcentaje de dinucleótidos CpG (A) y de los nucleótidos C y G (B) en ventanas de 2kb centradas en los picos de ATAC-Seq de las regiones SIT (superior) y no-SIT (inferior). Los resultados se muestran para diferentes tipos de regiones de cromatina abierta: ubicuas (gris), específicas del pulmón (verde),

específicas del hueso (rojo), específicas del corazón (azul) y específicas del hígado (marrón), así como para secuencias control seleccionadas de manera aleatoria (negro). Todos los SIT están orientados con las unidades de transcripción apuntando hacia la derecha. Las flechas negras indican una mayor proporción de C y G corriente arriba y corriente abajo del SIT, respectivamente (sesgo-GC). Los asteriscos señalan una disminución en las frecuencias por debajo de los niveles del control.

Posteriormente analizamos el enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción o TFBS (del inglés Transcription Factor Binding Sites) en cada tipo de RLN, tanto en las regiones SIT como en las no-SIT (Figura 14 y Anexo 2). Para comprender de manera clara lo que ocurre en hueso, nos enfocamos en entender los aspectos más significativos del enriquecimiento de TFBS encontrados solo en las RLN ubicuas y específicas de osteoblastos.

Por ejemplo, se ha documentado que ETS, SP y E2F6 desempeñan funciones importantes en promotores ubicuos y/o altamente transcritos [191], [192], [193], lo cual concuerda con el enriquecimiento de sus TFBS en los elementos SIT ubicuos de nuestro conjunto de datos (Figura 14A). Además, observamos que las regiones de cromatina abierta no-SIT ubicuas exhiben un enriquecimiento notable en TFBS para CTCF y MAZ, dos factores que se sabe que interactúan en insuladores y límites de cromatina [39], [40].

En contraste, encontramos que los SIT específicos de osteoblastos están enriquecidos en TFBS de SMAD, lo que coincide con la importancia de la vía BMP en este tipo celular. Por último, identificamos un enriquecimiento significativo de TFBS de reguladores osteogénicos conocidos en mamíferos en las RLN no-SIT específicas de osteoblastos (Figura 14B), incluyendo a AP-1, TEAD, RUNX2, NFIC, TWIST1/2 y NFAT [194], [195], [196], [197], [198], proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución.

En resumen, nuestros análisis de las características de secuencia respaldan la precisión en la identificación de cada tipo de región reguladora, ya sea SIT o no-SIT. Por consiguiente, anticipamos que las RLN no-SIT ubicuas contienen una mezcla diversa de enhancers e insuladores, mientras que el conjunto de datos de RLN no-SIT específicas de osteoblastos podría estar considerablemente enriquecido en enhancers osteogénicos.

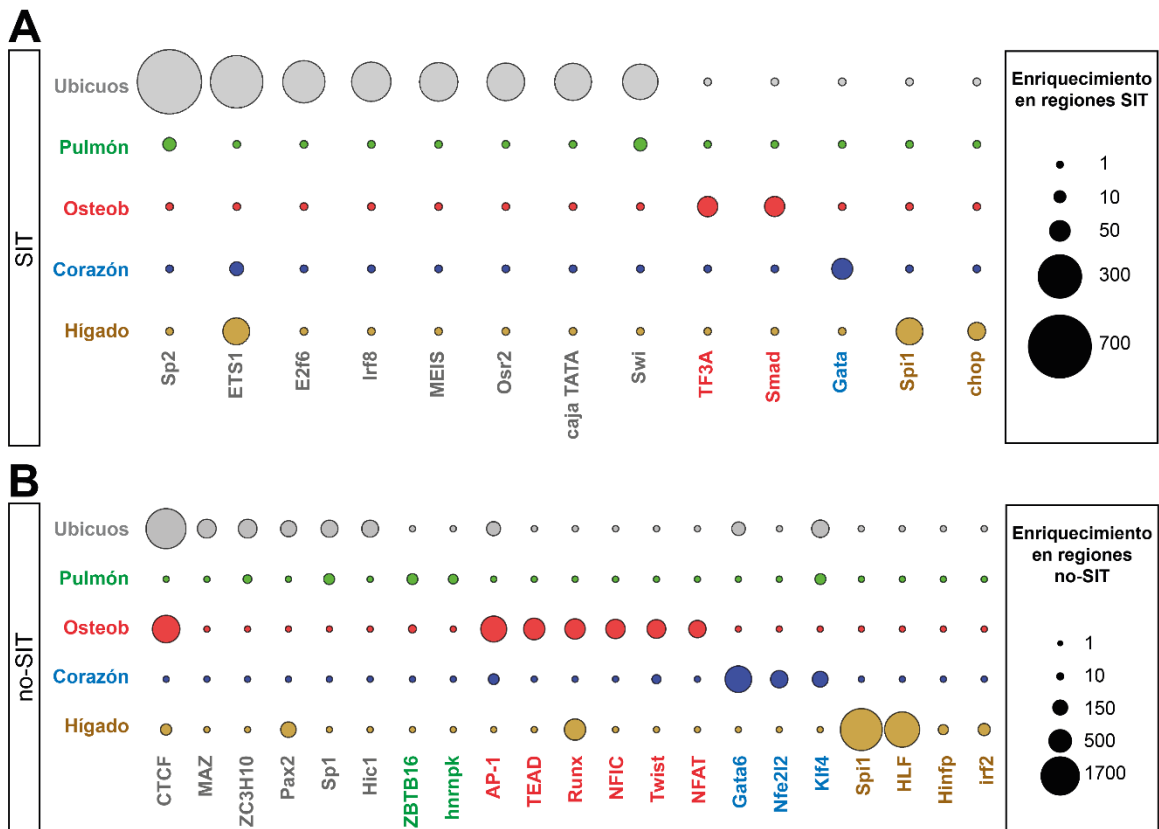


Figura 14. Enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción. Los TFBS más abundantes se muestran tanto en las regiones SIT **(A)** como en las no-SIT **(B)**. El tamaño de los círculos representa el factor de enriquecimiento, tal como se indica en los recuadros de la derecha.

3.1.4. Las regiones de cromatina abierta específicas de osteoblastos están asociadas con genes transcritos y presentan marcas de histonas de promotores y enhancers activos

Para confirmar experimentalmente que estas regiones contienen promotores activos y enhancers implicados en la activación transcripcional, evaluamos si la presencia de RLN se correlaciona con la expresión génica en osteoblastos e hígado de larva de *Xt*. Elegimos estas dos muestras debido a su alto número de regiones de interés identificadas y la señal específica de RLN que muestran (Figura 13A). Además, difieren en sus perfiles de CpG y C/G (Figura 13) y están enriquecidos en conjuntos distintos de sitios de unión a factores de transcripción (Figura 14), lo que hace que la comparación sea informativa desde una perspectiva de secuencia. Por lo tanto, se realizaron RNA-seq para osteoblastos e hígado de larva, y se compararon los perfiles de expresión génica entre ambos contextos celulares (Figura 15A). Los datos muestran que la especificidad tisular de las RLN SIT y no-SIT se correlaciona bien con los niveles de expresión génica. En particular, los genes adyacentes a un pico específico de osteoblastos de RLN no-SIT se expresan a niveles más altos en osteoblastos que en la muestra de hígado (Figura 15A). A su vez, las RLN ubicuas están asociadas con genes expresados a niveles similares entre ambos contextos celulares (Figura 15A).

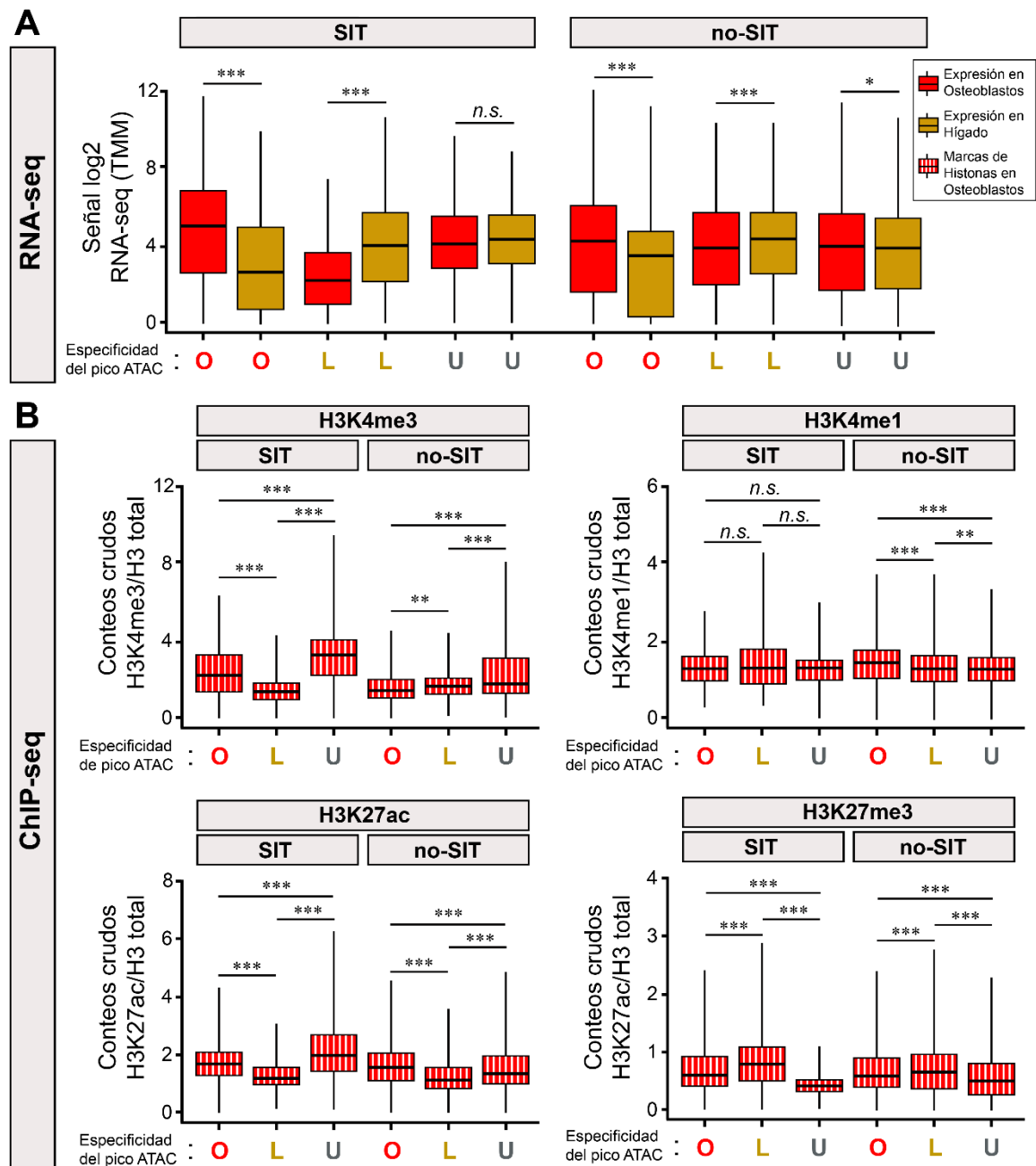


Figura 15. La expresión génica y las marcas de histonas confirman la identificación de promotores y enhancers osteogénicos activos. **(A)** Los diagramas de caja muestran la distribución de los valores TMM (log2) de RNA-Seq para la expresión génica en muestras de osteoblastos (rojo) o hígado (marrón). Se analizaron genes asociados con un pico de ATAC-Seq en su SIT (izquierda) o genes ubicados más cerca de un pico de ATAC-Seq no-SIT (derecha). **(B)** Los diagramas de caja muestran el enriquecimiento relativo de las marcas de cromatina H3K4me3, H3K4me1, H3K27Ac y H3K27me3 evaluadas por ChIP-seq en osteoblastos primarios de Xt. Los datos se presentan para regiones

específicas de osteoblastos (O), específicas de hígado (L) o ubicuas (U), tanto para SIT como para no-SIT. Se empleó una prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica y una corrección de p de Bonferroni para todos los análisis estadísticos (valores de p : ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; n.s., no significativo).

Para validar las regiones identificadas mediante ATAC-seq, se emplearon los datos previamente obtenidos de ChIP-seq de osteoblastos primarios recién extraídos y no cultivados de *Xt* [199]. Se realizaron análisis específicos para cuatro marcas de histonas asociadas de manera inequívoca con promotores activos (H3K4me3), enhancers activos (H3K4me1 y H3K27Ac) y regiones reprimidas (H3K27me3). Los datos muestran que los SIT abiertos (ya sea que alberguen una RLN específica de osteoblastos o ubicua) están enriquecidos en las marcas de promotor activo H3K4me3 y H3K27Ac y atenuados en H3K27me3 (Figura 15B). En contraste, los SIT específicos de hígado, que exhiben una configuración de cromatina cerrada en osteoblastos, muestran el patrón de marcas de histonas exactamente opuesto (Figura 15B). Las marcas de H3K27Ac y H3K27me3 confirmaron que las regiones no-SIT ubicuas y específicas de osteoblastos se encuentran en un estado transcripcionalmente activo, mientras que las regiones no-SIT específicas de hígado se hallan en un estado transcripcionalmente reprimido (Figura 15B). Notablemente, la marca de H3K4me1 exhibió su nivel más alto en las RLN no-SIT específicas de osteoblastos, lo que confirma aún más que corresponden a enhancers transcripcionales (Figura 15B). Finalmente, las regiones no-SIT ubicuas mostraron una combinación de marcas características de promotores (alto H3K4me3 y bajo H3K4me1, ver Figura 15B), lo que nos lleva a proponer que contienen una proporción significativa de SIT que aún no han sido anotados como tales en el genoma de *Xt*. Por consiguiente, la existencia de SIT no anotados en *Xt* explicaría el perfil de nucleótidos de las regiones no-SIT ubicuas, que se encuentra entre los SIT ubicuos y los enhancers específicos de tejido (Figura 15).

Detalladamente, hemos clasificado las regiones SIT osteoblasto-específicas según sus niveles de marca activadora (H3K4me3) y represora (H3K27me3). De un total de 527 SIT analizadas, el 41% mostró niveles altos de H3K4me3 y bajos de H3K27me3 (Promotores activos), el 51% exhibió la presencia o ausencia simultánea de ambas marcas (Promotores de actividad no validada), y el 12% presentó niveles bajos de H3K4me3 y altos de H3K27me3 (Promotores reprimidos) (Figura 16A, B). Es importante destacar que tanto el grupo de promotores activos como el de actividad no validada corresponden a genes con una expresión en osteoblastos significativamente mayor que la de los promotores reprimidos y la de genes elegidos de manera aleatoria (Figura 16C).

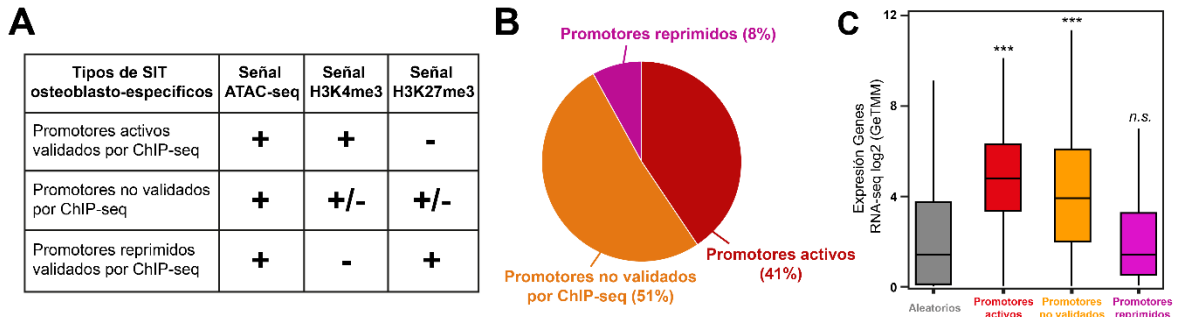


Figura 16. Categorización de las regiones de cromatina abierta SIT osteoblasto-específicas mediante ChIP-seq. **(A)** Se generaron tres grupos de RLN SIT osteoblásticas en dependencia de las marcas H3K4me3 y H3K27me3. **(B)** Gráfica circular que denota la proporción de promotores activos y reprimidos validados por ChIP-seq de un total de 547 RLN SIT osteoblásticas. **(C)** Nivel de expresión de los promotores categorizados utilizando como control genes seleccionados de manera aleatoria. Se empleó una prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica y una corrección de p de Bonferroni para todos los análisis estadísticos (valores de p: ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; n.s., no significativo).

Por otra parte, considerando que dentro de las regiones de cromatina abierta no-SIT identificadas por ATAC-seq podríamos tener una fracción de silenciadores, hemos evaluado los niveles de marcadores represivos (H3K27me3) y activadores (H3K27ac) de manera conjunta (Figura 17A). De las 6,457 regiones no-SIT en osteoblastos, el 31% exhibió niveles elevados de H3K27ac y bajos de H3K27me3 (Enhancers), el 67% mostró la presencia o ausencia simultánea de ambas señales (Elementos no validados), mientras que solo el 2% presentó una baja señal de H3K27ac y una alta señal de H3K27me3 (Silenciadores) (Figura 17B). A nivel de secuencia, los silenciadores validados por ChIP-seq están enriquecidos en sitios de unión a REST, un factor de transcripción reconocido por su función represiva [200], así como en sitios para CTCF, una proteína asociada no solo con insuladores, sino también con la activación y represión transcripcional [201], [202] (Figura 17C). En promedio, los genes adyacentes a los silenciadores identificados exhiben una expresión menor en comparación con los genes cercanos a enhancers validados por ChIP-seq y aquellos asociados con elementos no validados, mostrando niveles similares a los de genes seleccionados aleatoriamente (Figura 17D). En cambio, los elementos no validados carecen de sitios de unión a REST, pero sí a CTCF, además los genes cercanos presentan una expresión génica moderada (Figura 16C y 17D), lo que sugiere que este grupo contiene enhancers e insuladores. En resumen, los datos de RNA-seq y ChIP-seq respaldan sólidamente nuestra identificación de promotores, enhancers y silenciadores específicos de osteoblastos en *Xt*.

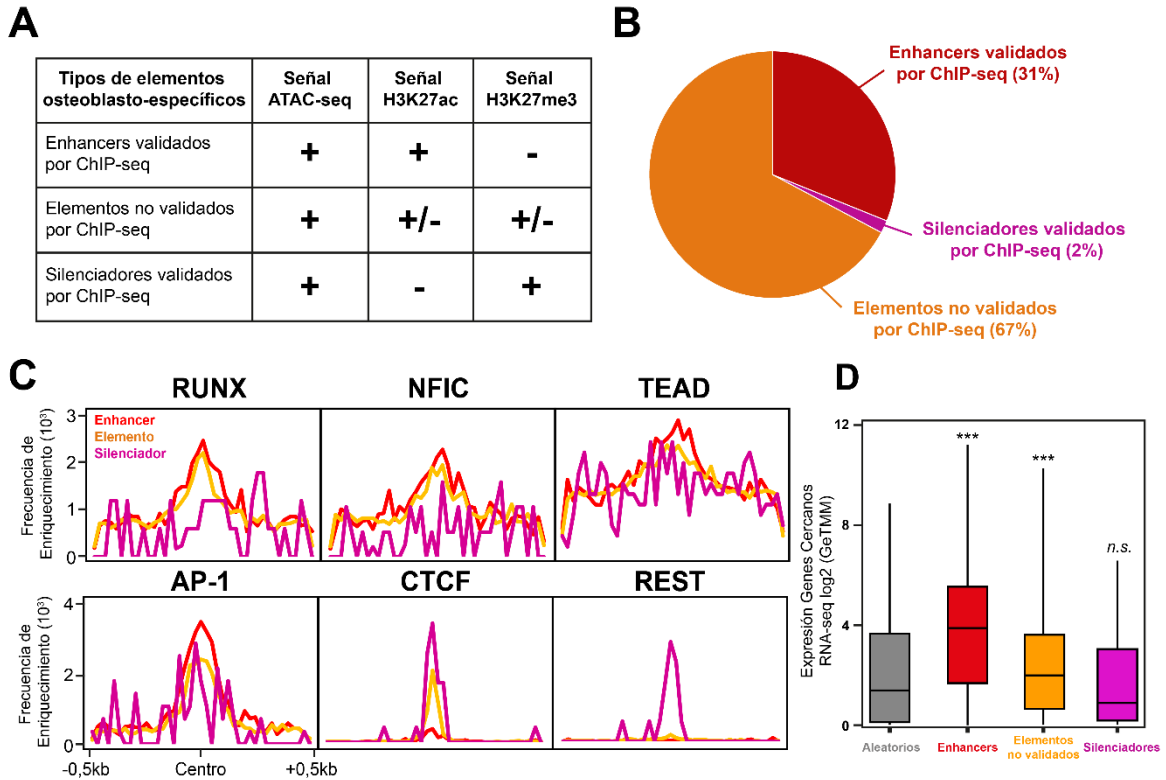


Figura 17. Categorización de las regiones de cromatina abierta no-SIT osteoblasto-específicas mediante ChIP-seq. **(A)** Se generaron tres grupos de RLN no-SIT osteoblásticas en dependencia de las marcas H3K27ac y H3K27me3. **(B)** Gráfica circular que denota la proporción de enhancers y silenciadores validados por ChIP-seq de un total de 6,457 RLN no-SIT osteoblásticas. **(C)** Frecuencia de enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción de los tres grupos categorizados. **(D)** Nivel de expresión de los genes adyacentes a las regiones categorizadas utilizando como control genes seleccionados de manera aleatoria. Se empleó una prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica y una corrección de p de Bonferroni para todos los análisis estadísticos (valores de p: ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; n.s., no significativo).

3.1.5. Grado de conservación de las regiones de cromatina abierta tejido-específicas y ubicuas de *X. tropicalis*

El hecho de que el grado de conservación de elementos regulatorios como enhancers y silenciadores difiera considerablemente en función de su especificidad tisular es intrigante, por lo que decidimos comparar nuestro conjunto de datos con siete especies pertenecientes al filo de los cordados como parte de la caracterización del paisaje regulatorio de osteoblastos en desarrollo de *Xt* y su consistencia durante la evolución (Figura 18). Para este propósito, utilizamos todas las RLN específicas de osteoblastos de *Xt* como secuencias *query* para realizar una serie de búsquedas de similitud utilizando BLASTN contra los genomas de la rana *Xenopus laevis* (una rana pipidae que divergió de *Xt* hace 48 millones de años [203]), de dos especies amniotas (humano y pollo, que

divergieron de *Xt* alrededor de 351-333 millones de años [204]), del pez cebra *Danio rerio* (un pez teleosteo que divergió de *Xt* alrededor de 458-449 millones de años [204]), del tiburón elefante *Callorhinchus milii* (un condricio que muestra elementos esqueléticos mineralizados, que divergió de *Xt* poco antes de la separación con la línea de peces teleosteos [205]), de la lamprea *Petromyzon marinus* (un ciclostomado, desprovisto de cualquier tipo de tejidos mineralizados, que divergió de *Xt* alrededor de 500 millones de años [206]), y del anfibio *Branchiostoma floridae* (una especie de cefalocordado no vertebrado que divergió de *Xt* alrededor de 550 millones de años [206]) (Figura 18A). Para fines de comparación, también realizamos análisis de BLASTN utilizando como secuencias *query* los elementos regulatorios específicos del pulmón, del corazón, del hígado y ubicuos, y también ejecutamos el mismo análisis con dos conjuntos de regiones seleccionadas al azar del genoma de *Xt* cuya longitud coincide con la longitud promedio de las RLN de SIT y no-SIT (Tabla 3). Calculamos un factor de enriquecimiento definido como el porcentaje de coincidencias obtenidas con cualquier tipo de RLN dividido por el porcentaje de coincidencias obtenidas con regiones aleatorias. Los datos presentados en la Figura 18B muestran que, en general, las RLN específicas de osteoblastos y de pulmón están bien conservadas (con varios factores de enriquecimiento superiores a 2), las RLN específicas de hígado son particularmente divergentes (con varios factores de enriquecimiento inferiores a 0,5), y las RLN de corazón y ubicuas exhiben un nivel de conservación intermedio, a menudo dando como resultado un factor de enriquecimiento cercano a 1 (Figura 18B). En general, este análisis muestra que las RLN osteoblásticas identificadas en *Xt* están bien conservadas, lo que permite investigar su relevancia funcional para la biología evolutiva del esqueleto y para las enfermedades óseas humanas, ya sea en relación con malformaciones congénitas o con procesos que obstaculizan la reparación de tejido óseo.

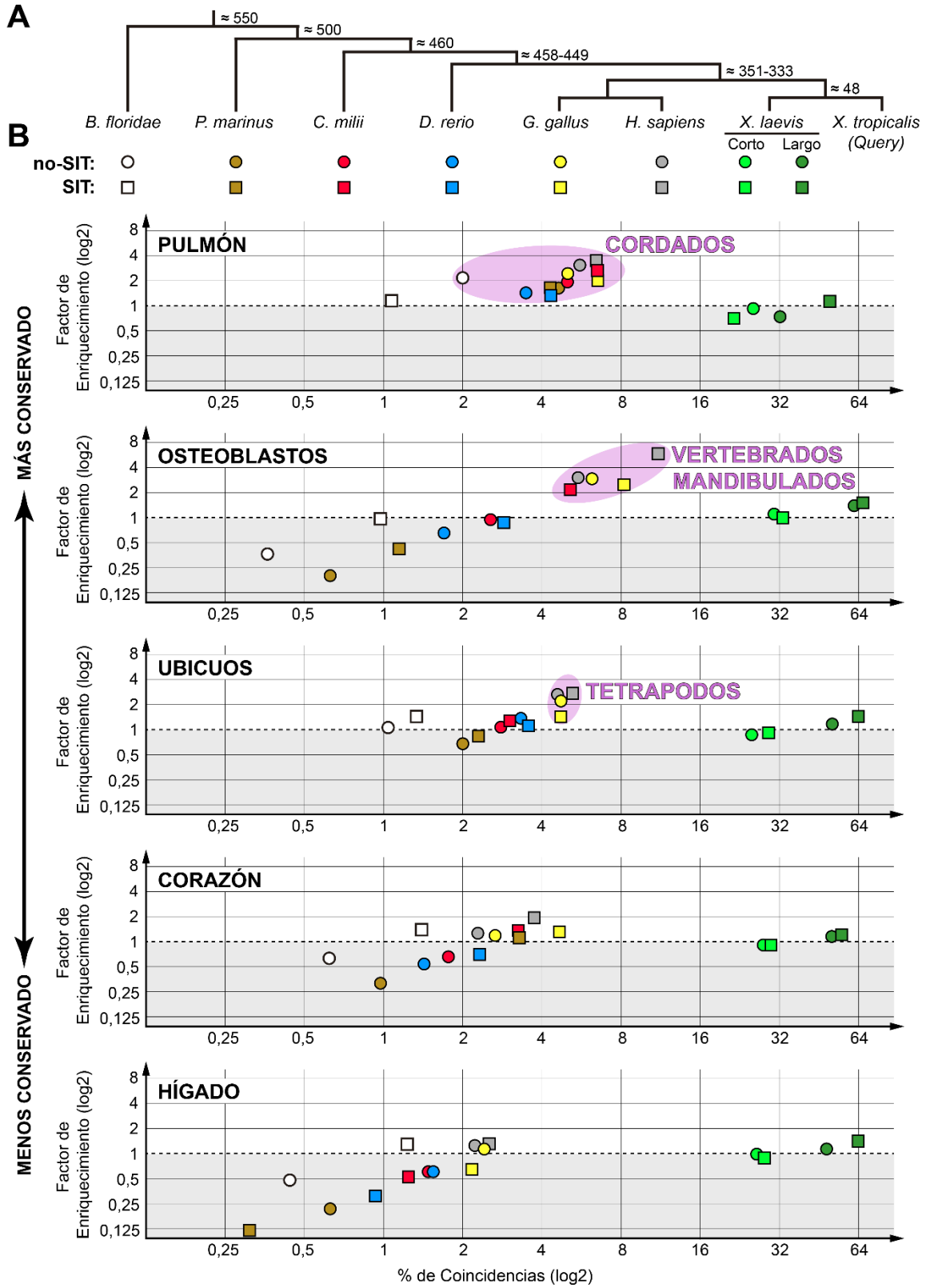


Figura 18. Conservación de secuencias de cromatina abierta en *Xt* entre siete especies de cordados. (A) Un cladograma muestra las relaciones filogenéticas del anfibio *Branchiostoma floridae*, la

lamprea *Petromyzon marinus*, el tiburón elefante *Callorhinchus milii*, el pez cebra *Danio rerio*, el pollo *Gallus gallus*, el humano *Homo sapiens*, las rana *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*, con el tiempo estimado de divergencia (en millones de años) indicado para cada nodo. **(B)** El grado de conservación de los picos de ATAC-Seq de *Xt* no-SIT (representados como círculos) o SIT (representados como cuadrados) se evaluó mediante BLASTN contra los genomas de las especies mencionadas anteriormente. Al realizar el BLASTN en la rana alotetraploide *X.l.*, se consideraron por separado los subgenomas corto (en verde claro) y largo (en verde oscuro). Los gráficos muestran en el eje x el porcentaje de regiones cuyo alineamiento coincidió con el del query, y en el eje y el factor de enriquecimiento en comparación con una selección de regiones aleatorias de *Xt*. Para facilitar la comparación, el área donde los valores de enriquecimiento son inferiores a 1 (línea punteada) está sombreada en gris claro. Las elipses rosadas resaltan los grupos de regiones conservadas no-SIT y SIT, y el nombre indicado se refiere al grupo filogenético en la base del cual se puede inferir que al menos una fracción de estos elementos reguladores emergieron.

Tabla 3. La tabla presenta el número de coincidencias obtenidas para cada uno de los genomas de cordados analizados (*X.l.*, *Xenopus laevis*; *G.g.*, *Gallus gallus*; *H.s.*, *Homo sapiens*; *D.r.*, *Danio rerio*; *C.m.*, *Callorhinchus milii*; *P.m.* *Petromyzon marinus*; *B.f.*, *Branchiostoma floridae*).

	Tamaño del query	Número de coincidencias de BLASTN contra los genomas de las especies de cordados indicadas.							
		<i>X.l.</i> (genoma L)	<i>X.l.</i> (genoma S)	<i>G.g.</i>	<i>H.s.</i>	<i>D.r.</i>	<i>C.m.</i>	<i>P.m.</i>	<i>B.f.</i>
Picos SIT	Osteoblasto-específicos (527 regiones)	342	168	43	58*	15	27	6	5
	Hígado-específicos (326 regiones)	205	88	7	8	3	4	1	4
	Corazón-específicos (218 regiones)	118	63	10	8	5	7	7	3
	Pulmón-específicos (93 regiones)	46	20	6	6	4	6	4	1
	Ubicuos (5945 regiones)	3847	1720	281	307	208	179	136	79
	Aleatorios (651 regiones)	283	196	21	12	20	15	17	6
Picos no-SIT	Osteoblasto-específicos (6747 regiones)	4256	2094	417	367*	113	170	42	24
	Hígado-específicos (7259 regiones)	3495	1936	171	159	107	110	45	32
	Corazón-específicos (2283 regiones)	1143	642	60	52	32	40	22	14
	Pulmón-específicos (804 regiones)	260	205	40	45	28	40	37	16
	Ubicuos (8706 regiones)	4434	2206	410	402	291	243	175	90
	Aleatorios (6530 regiones)	2792	1848	134	114	158	163	186	60

3.1.6. Validación cruzada de secuencias conservadas que exhiben una RLN específica de osteoblastos tanto en rana como en humano.

El alto nivel de conservación que tienen las RLN de osteoblastos de *Xt* en mamíferos, nos llevó a preguntarnos si estos elementos también se encuentran activos en el hueso de los humanos.

Primeramente, confirmamos la conservación de la sintenia al demostrar que ~90% de las RLN homólogas se encuentran adyacentes a los mismos genes en ambas especies (Anexo 3). Posteriormente, examinamos si las RLN específicas de osteoblastos conservadas identificadas en *Xt* también presentan una configuración de cromatina abierta en humano, utilizando datos disponibles de ATAC-Seq de osteoblastos diferenciados *in vitro* desde células madre [207]. De las 425 RLN específicas de osteoblastos de *Xt* conservadas en el genoma humano (58 SIT y 367 no-SIT, ver Tabla 3), encontramos que 162 (38%) muestran un pico de ATAC-seq osteoblástico en *Hs* (Figura 19). Por otra parte, al analizar los resultados de ChIP-seq en osteoblastos de *Xt* (ver Figura 16A), se observa que, de las 162 regiones identificadas, 17 exhiben marcas de promotores activos (alto H3K4me3 y bajo H3K27me3), 64 muestran marcas de enhancers (alto H3K27ac y bajo H3K27me3), mientras que solo 1 presenta marcas de silenciadores (bajo H3K27ac y alto H3K27me3) (ver Figura 19B). Es importante destacar que no se observó asociación con picos de ATAC-seq osteoblásticos de *Hs* para los subconjuntos de regiones de tejidos control (correspondientes a secuencias aleatorias de *Xt*, o RLN de *Xt* específicas de hígado, corazón o pulmón) que se alinean con el genoma humano (Figura 20).

Luego, evaluamos el grado de especificidad de los 162 RLN osteoblásticos humanos conservados siguiendo una estrategia similar al enfoque sustractivo que empleamos en la rana (Figura 21A, B). Para esto, seleccionamos conjuntos de datos de ATAC-Seq de hígado, corazón y pulmón humanos disponibles para mantener la homogeneidad conceptual, aunque las composiciones celulares de estas muestras podrían diferir de nuestros tejidos de control de *Xt*. Sin embargo, el agrupamiento jerárquico confirmó una mayor similitud para corazón y pulmón, y que la muestra de osteoblastos difiere sustancialmente de los otros tres tejidos, como era de esperar a partir de los datos en rana (Figura 10B) y ratón [66] (Figura 19). Encontramos que los enhancers, silenciadores y promotores humanos identificados muestran globalmente una conformación de cromatina más abierta en osteoblastos que en hígado, corazón o pulmón, coincidiendo con la especificidad tisular característica de sus regiones regulatorias homólogas de *Xt* (Figura 19B). Varias de las regiones que además poseen marcas activadoras en *Xt*, se encuentran cerca de genes que codifican para factores de transcripción osteogénicos (*runx2*, *dlx5*, *nfatc1* y *nfia*) y proteínas que participan en vías de señalización importantes para el desarrollo de hueso en mamíferos como Notch, *Ihh* y FGF (Figura 19C). Respecto a aquellas regiones con señales represivas en *Xt*, identificamos que el silenciador se encuentra cercano a *sox5*, gen asociado a la formación de cartílago [208], mientras que los promotores reprimidos corresponden a *rhoj* y *meis2*, este último reconocido por participar en la condensación mesenquimática para la formación de hueso [209] (Figura 19B). Notablemente, en términos globales, los promotores, enhancers y silenciadores osteoblásticos filtrados por validación cruzada se encuentran en loci de genes involucrados en enfermedades esqueléticas (Figura 22), donde destacan la osteoartritis (*adam12*), osteoporosis (*etv1*), geroderma osteodisplásico (*gorab*), síndrome de Keipert (*gpc4*), síndrome de Buschke-Ollendorff (*lemd3*), displasia cleidocraneal (*runx2*) y síndrome tricornofalángico tipo I (*trps1*) (Figura 19C). Si bien las regiones reguladoras específicas

de osteoblastos reportadas aquí pueden no estar directamente involucradas en la etiología de las enfermedades mencionadas, su identificación mejora considerablemente nuestra comprensión del control transcripcional de estos genes.

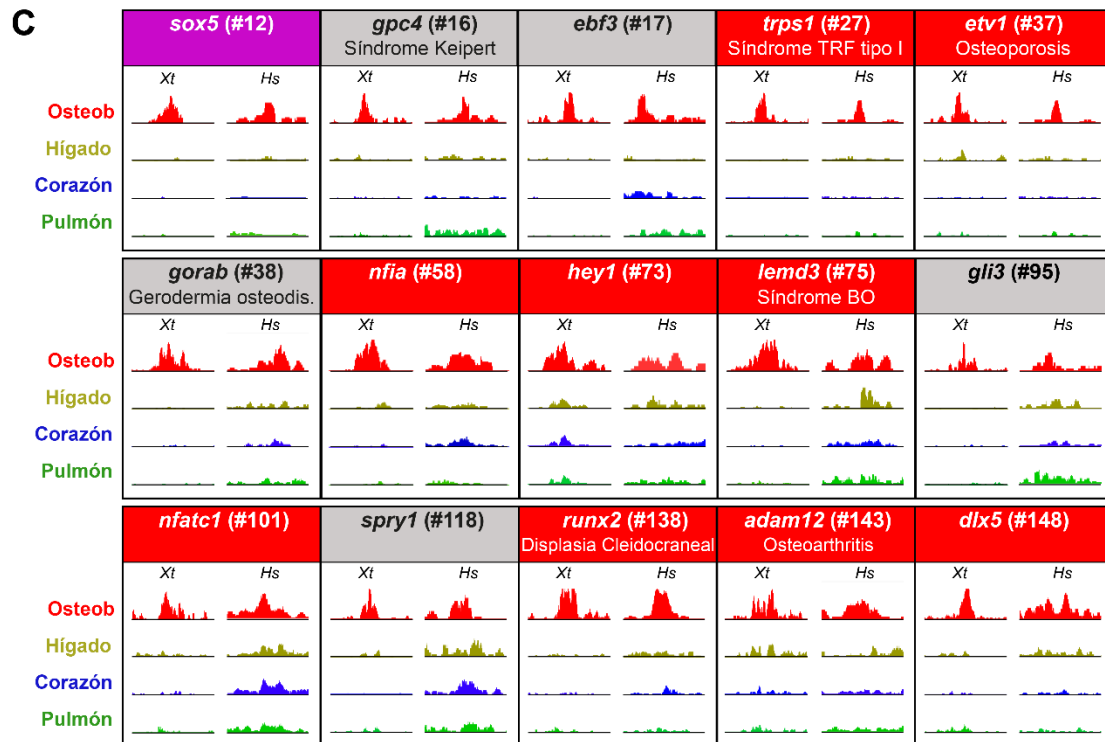
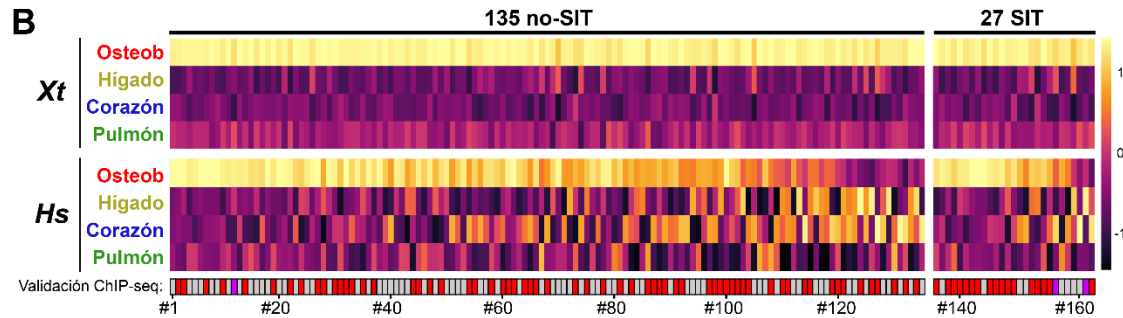
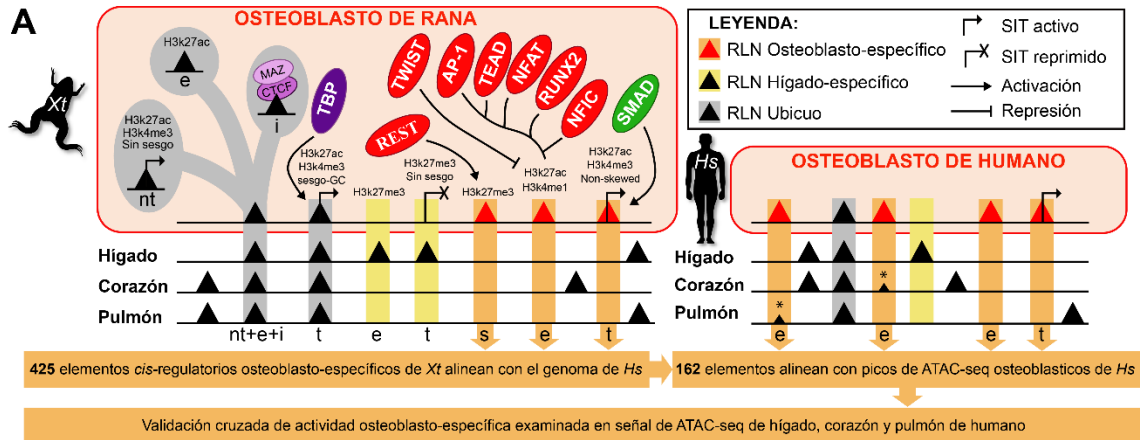


Figura 19. Resumen de los principales hallazgos y validación cruzada de los enhancers, silenciadores y promotores específicos de osteoblastos con relevancia médica y evolutiva. **(A)** Integración de datos de ATAC-Seq, RNA-Seq, ChIP-Seq y análisis genómicos. Las líneas horizontales representan el genoma de *Xenopus tropicalis* (*Xt*) y *Homo sapiens* (*Hs*), mientras que los triángulos indican la presencia de RLN en diversos contextos biológicos. Las proteínas que se unen a los elementos reguladores de *Xt* se infieren a partir de enriquecimientos de TFBS. Abreviaturas: nt para SIT no anotados, t para SIT anotados, e para enhancers, i para insuladores y s para silenciadores. La estrategia de validación cruzada se muestra en la parte inferior, y los asteriscos indican que, con el fin de reducir los falsos negativos, se aceptaron los RLN de *Hs* con una baja señal de ATAC-Seq en tejidos blandos. **(B)** Validación cruzada de un conjunto de 135 enhancers y silenciadores osteoblásticos (izquierda, números del 1 al 135) y 27 promotores osteoblásticos (derecha, números del 136 al 162) conservados entre la rana y el humano. Cada columna representa un RLN conservado único cuya señal se cuantificó en las cuatro muestras de cada especie y se codificó por colores para facilitar la comparación, como se indica en la escala a la derecha. Los RLN validados por ChIP-seq de osteoblastos de *Xt* se indicaron mediante rectángulos rojos (marcas activadoras) y rectángulos púrpura (marcas represivas), mientras que los que no fueron validados por esta técnica se muestran en gris. **(C)** Perfiles representativos de 1,5kb de RLN osteoblásticos conservados de *Xt* y *Hs* presentes en los loci indicados. La numeración y el sombreado rojo/púrpura/gris son como se describió en (B). También se mencionan las enfermedades esqueléticas, cuando se conocen para un gen específico. Abreviaturas: BO para Buschke-Ollendorff, Osteodis para Osteodisplástica, Osteob para Osteoblasto, y TRF para Trichorinofalángico.

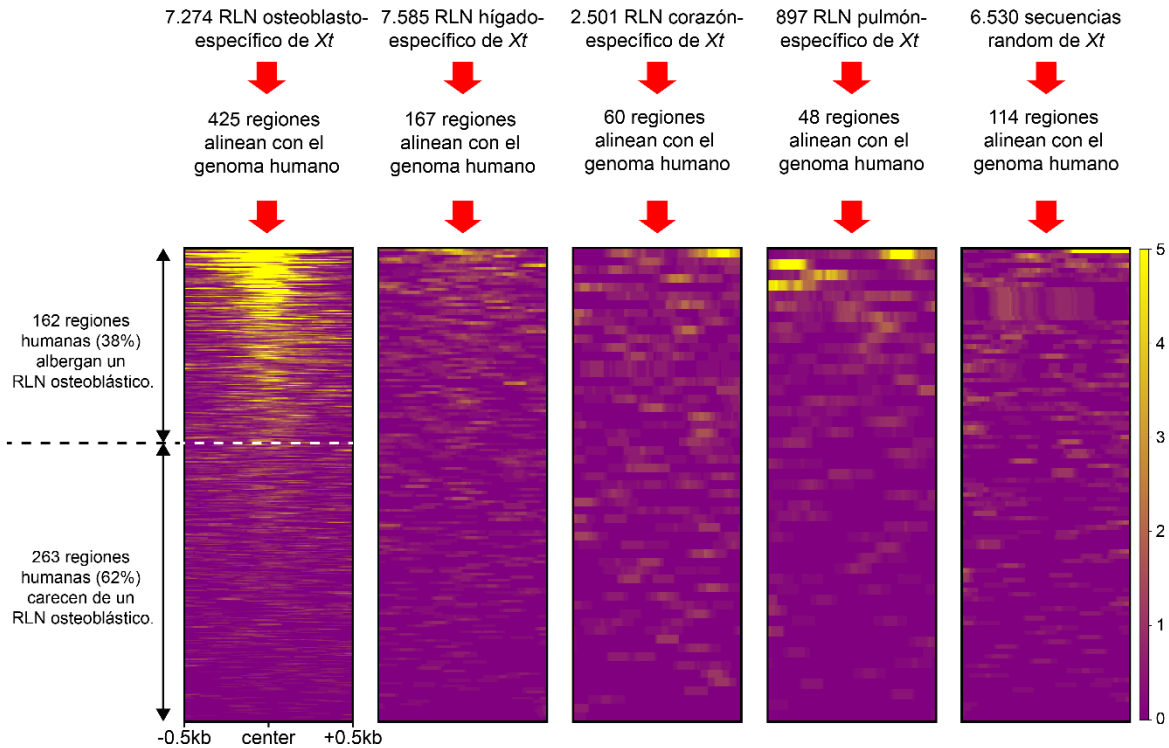


Figura 20. Superposición significativa entre RLN osteoblásticas conservadas de *Xt* y *Hs*. Los gráficos de calor ilustran la intensidad de la señal de ATAC-Seq en osteoblastos humanos, segmentada en ventanas de 1kb y representada mediante una escala de colores (ubicada a la derecha). De un total de 7.274 RLN específicas de osteoblastos de *Xt*, 425 regiones se alinean con el genoma humano. Dentro de este grupo, el 38% (162 RLN, tal como se muestra en la Figura 19B) contiene una RLN en osteoblastos humanos (columna izquierda). En contraste, los subconjuntos de RLN específicos de hígado, corazón o pulmón de *Xt* que se alinean con el genoma humano no exhiben un enriquecimiento significativo en la señal de ATAC-Seq de osteoblastos humanos (comparado con los resultados obtenidos de regiones seleccionadas aleatoriamente de *Xt*, representados en la columna derecha).

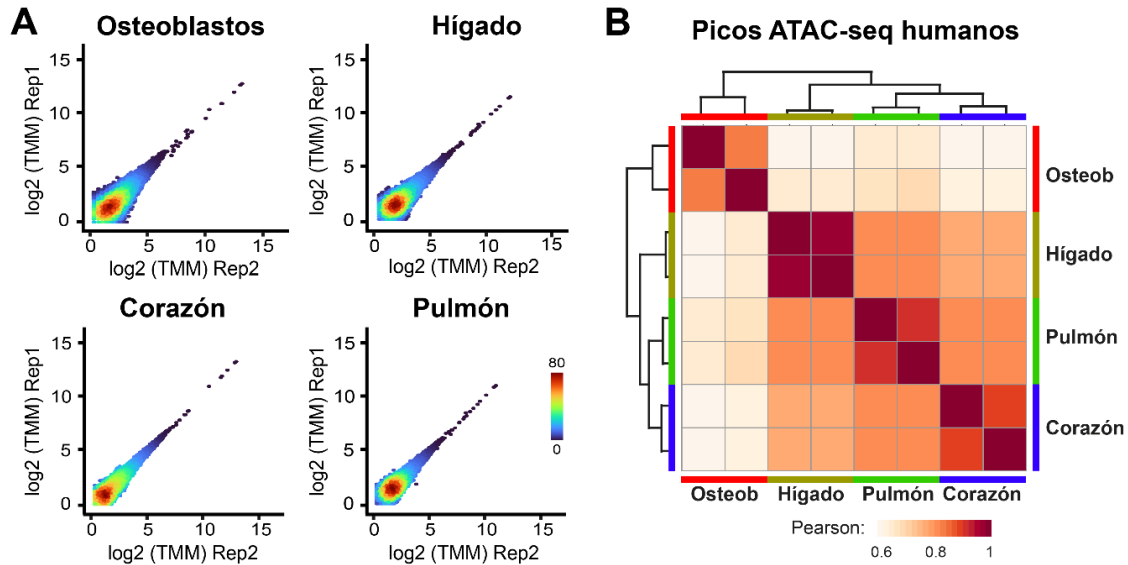


Figura 21. Validación de las librerías de ATAC-Seq humanas. **(A)** Correlación de la señal de RLN entre ambas réplicas de cada una de las muestras analizadas. Se presentan los valores de correlación de Pearson. **(B)** Mapa de calor que exhibe el coeficiente de correlación de Pearson y el agrupamiento jerárquico de todos los picos de ATAC-Seq identificados en cada muestra.

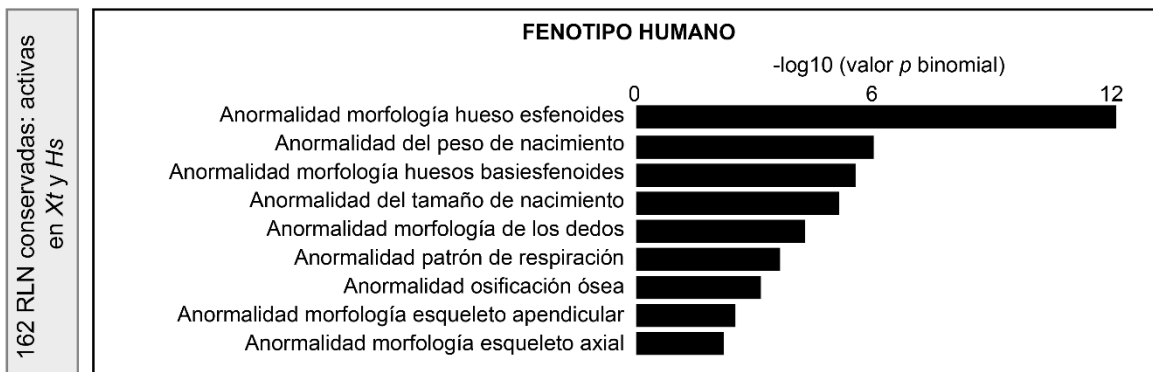


Figura 22. Análisis GREAT sobre las regiones filtradas mediante validación cruzada. El gráfico muestra el enriquecimiento de fenotipos asociados con las alteraciones de genes que están más próximos a las 162 RLN conservadas y activas en *Xt* y *Hs*.

3.2. Caracterización del paisaje regulatorio del hueso durante procesos regenerativos

En este trabajo hemos observado que, en comparación con otros tejidos, la lógica regulatoria de los osteoblastos de *Xenopus tropicalis* durante el desarrollo exhibe un notable grado de conservación con la de los humanos. Sin embargo, es importante destacar que, tras una lesión, existe una marcada disparidad en el potencial de regeneración ósea entre ambas especies. Por lo tanto, hemos considerado de interés identificar los elementos en *cis*- que podrían estar controlando

transcripcionalmente la regeneración ósea intramembranosa y, de esta manera, profundizar sobre las diferencias y similitudes que existen entre anfibios y humanos.

3.2.1. Estandarización de la regeneración intramembranosa de *Xenopus tropicalis*

Inicialmente, nos centramos en analizar las características histológicas y del tejido completo durante las fases temprana y tardía del proceso de mineralización en la calvaria larval de *Xt* tras una lesión craneal. Para lograr esto, provocamos una lesión craneal por medio del uso de un microtaladro y monitoreamos la regeneración ósea utilizando la estrategia de doble tinción con los quelantes de calcio Alizarin Red (que produce fluorescencia roja a 650nm) y Calcein Green (que produce fluorescencia verde a 514nm). El pulso con Alizarin Red se administró antes de realizar la trepanación en la calvaria, lo que permitió marcar el hueso formado previo a la lesión, mientras que el pulso con Calcein Green se aplicó después del proceso de regeneración, marcando así el hueso formado posterior a la lesión.

A los 5 días post-lesión (5dpl), observamos que la herida se encuentra cubierta por un tejido altamente vascularizado y no mineralizado (Figura 23A). Los cortes histológicos en sentido coronal teñidos con hematoxilina-eosina nos permiten sugerir que este tejido está compuesto por una combinación de células mesenquimales y del sistema inmunitario (Figura 23C, panel izquierdo).

Para el día 15 post-lesión (15dpl), notamos que este tejido que recubre la herida había mineralizado formando una delgada capa de hueso nuevo (osteoides) que cubre toda el área afectada (Figura 23B). Los cortes histológicos permitieron distinguir la presencia de osteoblastos y osteoclastos, células responsables de la remodelación ósea (Figura 23C, panel derecho), así como algunas fibras de colágeno con una disposición irregular (Figura 23D). En términos generales, el tejido que recubre la herida a los 5dpl sirve como muestra de una fase regenerativa temprana previa a la mineralización, mientras que el tejido formado a los 15dpl representa una muestra de regeneración tardía ya mineralizada, por lo que ambas condiciones fueron utilizadas para los experimentos genómicos y transcriptómicos.

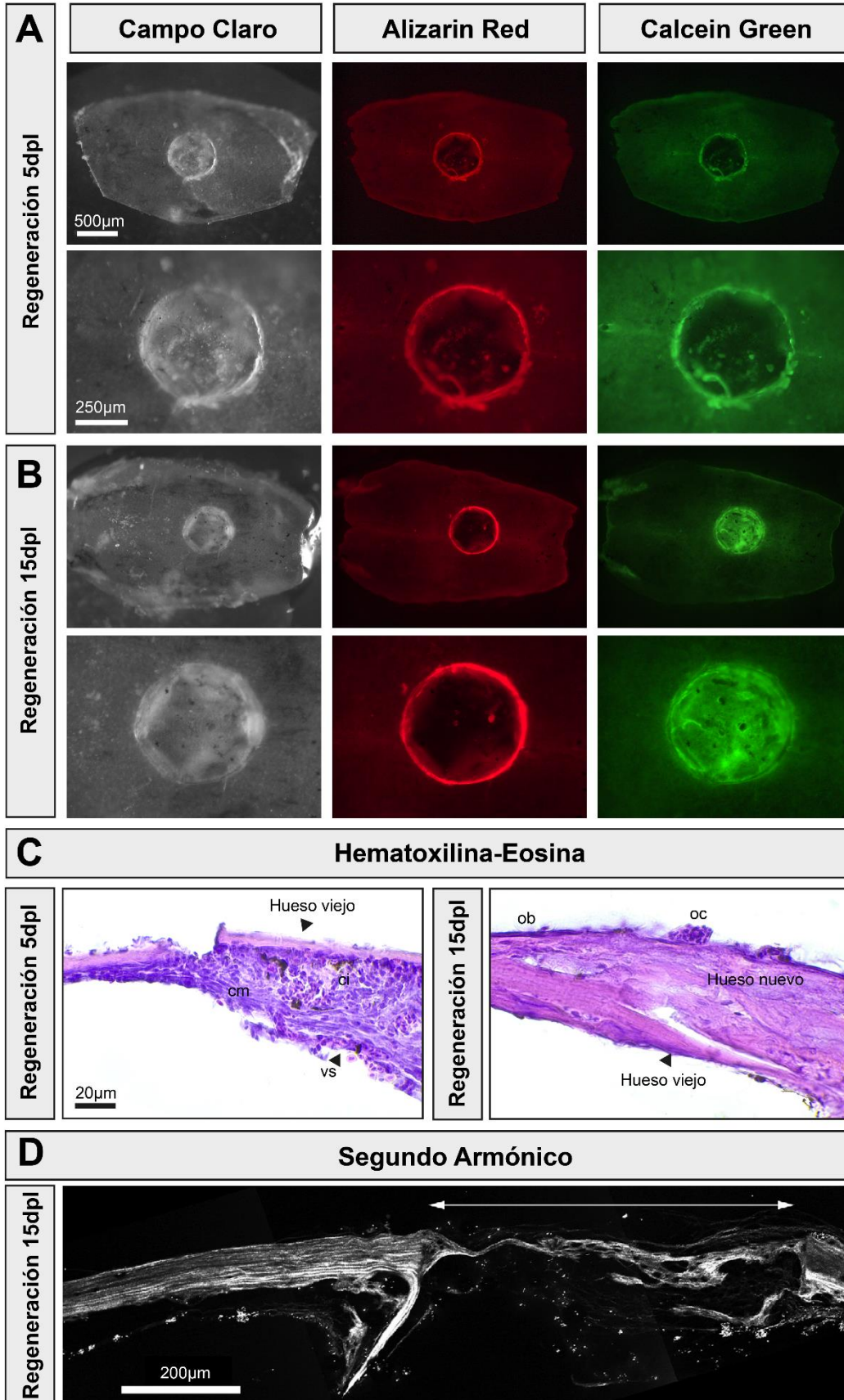


Figura 23. Características celulares y tisulares de la regeneración ósea de *Xenopus tropicalis*. **(A, B)** Imágenes de campo claro y de fluorescencia de las calvarias disecadas de larvas trepanadas de *Xt*. Estas larvas fueron sometidas previamente a un pulso de Alizarin Red una hora antes de sufrir una lesión craneal, y posteriormente expuestas a un pulso de Calcein Green a los 5 **(A)** o 15 **(B)** días post-lesión. **(C)** Cortes histológicos en sentido coronal teñidos con hematoxilina eosina a 5 dpl (panel izquierdo) y 15dpl (panel derecho). Abreviaturas: células mesenquimales (cm), células inmunes (ci), vasos sanguíneos (vs), osteoblastos (ob), osteoclastos (oc). **(D)** Imagen de colágeno obtenida por segundo armónico. El sitio de impacto está delimitado por una doble flecha.

3.2.2. Clusterización de genes diferenciales expresados en el desarrollo y la regeneración de calvaria de *Xenopus tropicalis*

Con el propósito de identificar los genes expresados durante la regeneración de la calvaria y compararlos con los genes implicados en su desarrollo, efectuamos ensayos de RNA-seq por duplicado utilizando cuatro muestras distintas: la región regenerativa en su etapa temprana 5dpl (muestra "REG-5"), y en su etapa tardía 15dpl (muestra "REG-15"), así como precursores osteogénicos indiferenciados (muestra "MES", obtenidos del mesénquima craneal de larvas NF52) (una de las réplicas de MES fue obtenida en el trabajo de tesis doctoral de Patricia Hanna, 2014), y osteoblastos diferenciados (muestra "OST", extraídos de los cráneos de larvas NF58). Cabe destacar que este último se refiere al mismo RNA-seq mencionado en la sección 3.1.4.

Corroboramos la calidad del ARN extraído a través de análisis por Bioanalyzer, donde cada muestra obtuvo un valor de RIN (integridad de ARN) superior a 8,0 (Anexo 4). Una vez que las muestras fueron secuenciadas y procesadas a través de programas bioinformáticos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), donde se evidenció la consistencia entre las réplicas y se observó que, aunque REG-5 aún no ha alcanzado la mineralización, su perfil transcriptómico global presenta una mayor similitud con el de OST que con el de MES (Figura 24A). Posteriormente, se llevó a cabo una clusterización de los genes sobre regulados, clasificándolos de la siguiente manera: Clúster 1, expresados exclusivamente en el mesénquima; Clúster 2, expresados exclusivamente en osteoblastos; Clúster 3, expresados exclusivamente en la regeneración 5dpl; Clúster 4, expresados exclusivamente en la regeneración 15dpl; Clúster 5, expresados tanto en el mesénquima como en la regeneración 5dpl; Clúster 6, expresados tanto en osteoblastos como en la regeneración 15dpl; Clúster 7, expresados en todas las muestras esqueléticas, pero no expresados en hígado (Figura 24B). El análisis de Ontología Génica (GO) reveló que el Clúster 1 presenta términos relacionados con el patrón anteroposterior del embrión y el desarrollo temprano del hueso, además de términos asociados a cromóforos, los cuales podrían estar determinados por las células pigmentadas adheridas al tejido mesenquimático craneal (Figura 24C). Por otro lado, el Clúster 2 está enriquecido en términos asociados a la regulación de la diferenciación de osteoblastos, mientras que los Clústeres 3 y 4 están relacionados con procesos del sistema inmunitario y la coagulación (Figura 24C). El Clúster 5 está compuesto por genes clásicos del desarrollo del sistema nervioso, como *sox2*

y *otx2* que también tienen una función reportada en las células mesenquimáticas osteogénicas [115], [210]. El Clúster 6, que incluye muestras de la fase tardía del desarrollo (osteoblastos) y la regeneración (15dpi), presenta términos relacionados con la osificación y la vía hedgehog (Figura 24C). Finalmente, el Clúster 7 está compuesto por genes clave para la formación del cráneo y la organización de la matriz extracelular (Figura 24C).

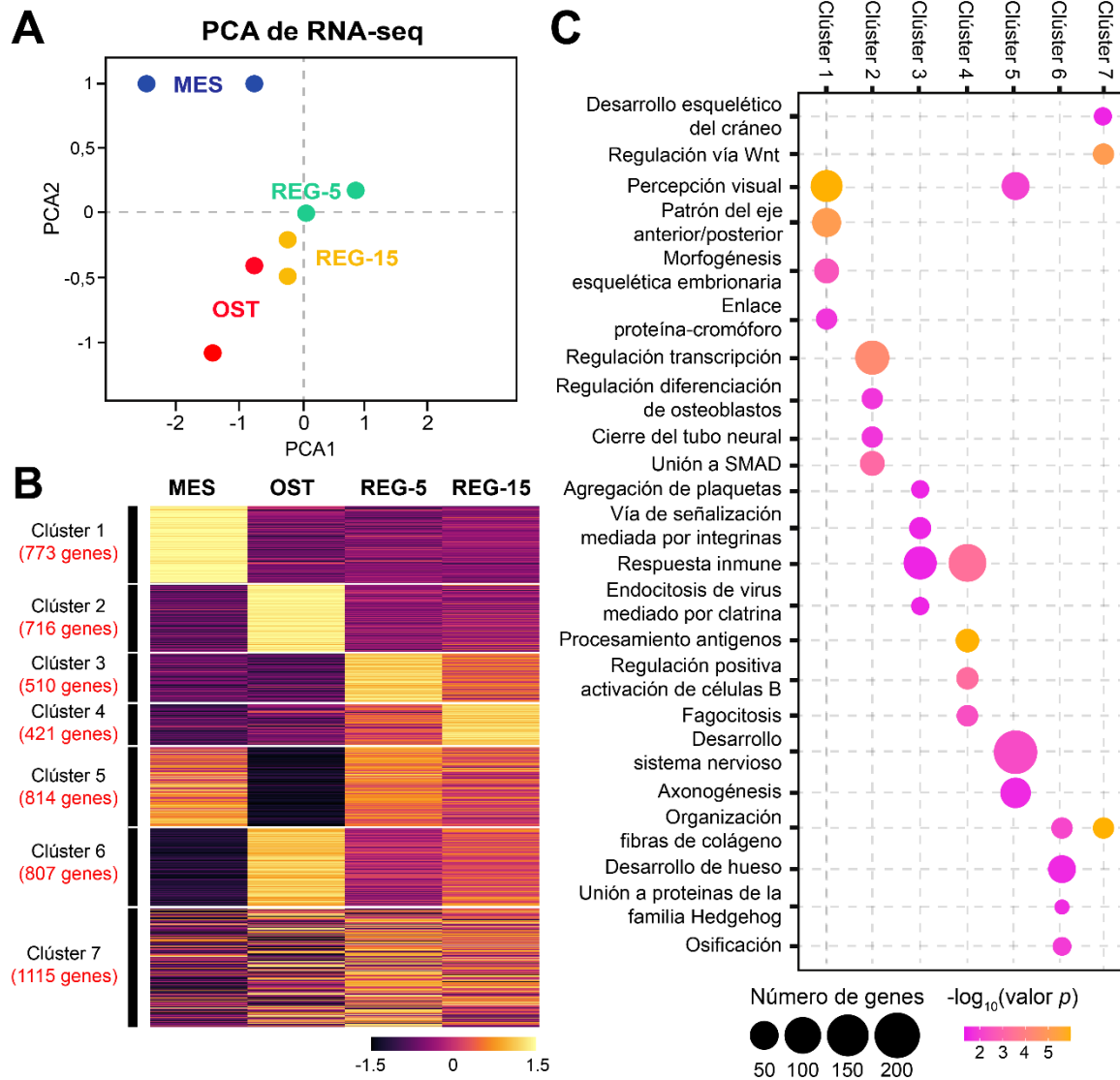


Figura 24. Clusterización de perfiles de expresión de transcritos. **(A)** Análisis de componentes principales (PCA) incluyendo desarrollo óseo (MES y OST) y regeneración ósea (REG-5 y REG-15). **(B)** Mapa de calor de 6 clústeres difusos utilizando las cuatro muestras de RNA-seq relacionadas con el hueso. Los colores representan valores de expresión normalizados (puntuación z). **(C)** Gráfico de burbujas con los principales términos de ontología génica (GO) enriquecidos en cada uno de los 7 clústeres. El tamaño de la burbuja denota el número de genes significativos asociados con un término particular y los colores indican el valor de p calculado usando una prueba exacta de Fisher

de dos lados y ajustado utilizando el método de Benjamini-Hochberg para pruebas de hipótesis múltiples.

3.2.3. Clusterización de elementos *cis*-regulatorios implicados en el desarrollo y la regeneración de calvaria de *Xenopus tropicalis*

Una vez identificados y agrupados los genes expresados de manera diferencial en las fases tempranas y tardías del desarrollo y la regeneración craneal de *Xt*, procedimos a investigar los elementos en *cis*- que regulan su expresión. Para ello, realizamos duplicados de ATAC-seq utilizando los mismos tejidos empleados en los ensayos de RNA-seq. Observamos que tanto las librerías (antes de la secuenciación) (Figura 25A, recuadros) como los alineamientos (después de la secuenciación) exhibieron la característica distribución de fragmentos con un patrón nucleosomal, destacándose un enriquecimiento significativo en la fracción de RLN y mononucleosomas (Mono-) (Figura 25A). El PCA reveló que el paisaje regulatorio de las réplicas es coherente, y que, al igual que en el panorama transcripcional, REG-5 y REG-15 muestran una mayor similitud con OST que con MES (Figura 25B). Utilizando las anotaciones del genoma, distinguimos que las RLN que coinciden con un SIT (-500pb a +200pb) representan entre un 28% y un 39% del total de elementos identificados por ATAC-seq, mientras que las regiones fuera de los SIT comprenden entre un 61% y un 72% (Figura 25C). Luego, procedimos a clusterizar los RLN generando clústeres homólogos a los efectuados con los datos de RNA-seq. Para distinguir de los clústeres de RNA-seq, empleamos números romanos para el ATAC-seq. Los clústeres de ATAC-seq se identificaron siguiendo una lógica similar al RNA-seq: Clúster I, RLN exclusivas de mesénquima; Clúster II, RLN exclusivas de osteoblastos; Clúster III, RLN exclusivas de regeneración 5dpl; Clúster IV, RLN exclusivas de regeneración 15dpl; Clúster V, RLN presentes tanto en el mesénquima como en la regeneración 5dpl; Clúster VI, RLN presentes tanto en osteoblastos como en la regeneración 15dpl; Clúster VII, RLN presentes en todas las muestras esqueléticas menos en hígado (Figura 25D).

Tabla 4. Combinación de transcritos y RLN contenidos en los Clústeres de RNA-seq y ATAC-seq, respectivamente.

Clústeres de RNA-seq	Clústeres de ATAC-seq	MES	OST	REG-5	REG-15
1	I	+	-	-	-
2	II	-	+	-	-
3	III	-	-	+	-
4	IV	-	-	-	+
5	V	+	-	+	-
6	VI	-	+	-	+
7	VII	+	+	+	+

Al comparar la cantidad de RLN osteoblasto-específicas, previamente obtenidas mediante sustracción con tejidos blandos (Figura 11A), con el número de elementos que componen el Clúster II, observamos una disminución de 527 a 110 regiones SIT y de 6.747 a 2.876 regiones no-SIT. Esto se debe a que las muestras de desarrollo y regeneración ósea, tanto en fases tempranas como tardías, poseen características celulares y moleculares similares a las de los osteoblastos. Por lo tanto, analizamos cuál de todas las muestras osteogénicas comparte más elementos en *cis*- con el paisaje regulatorio osteoblástico ya caracterizado (Figura 26). Observamos que el 72% de las regiones SIT y el 35% de las regiones no-SIT están presentes en todas las muestras relacionadas con el hueso, independientemente de si están en fase temprana o tardía. El 2% de las regiones SIT y el 7% de las regiones no-SIT adoptan una configuración abierta en una fase previa a la mineralización de la calvaria en desarrollo. El 2% de las regiones SIT y el 4% de las regiones no-SIT se mantienen en el proceso de regeneración temprana, mientras que el 4% de las regiones SIT y el 11% de las regiones no-SIT adoptan una configuración abierta exclusivamente en procesos de mineralización, ya sea en desarrollo o en regeneración (Figura 26).

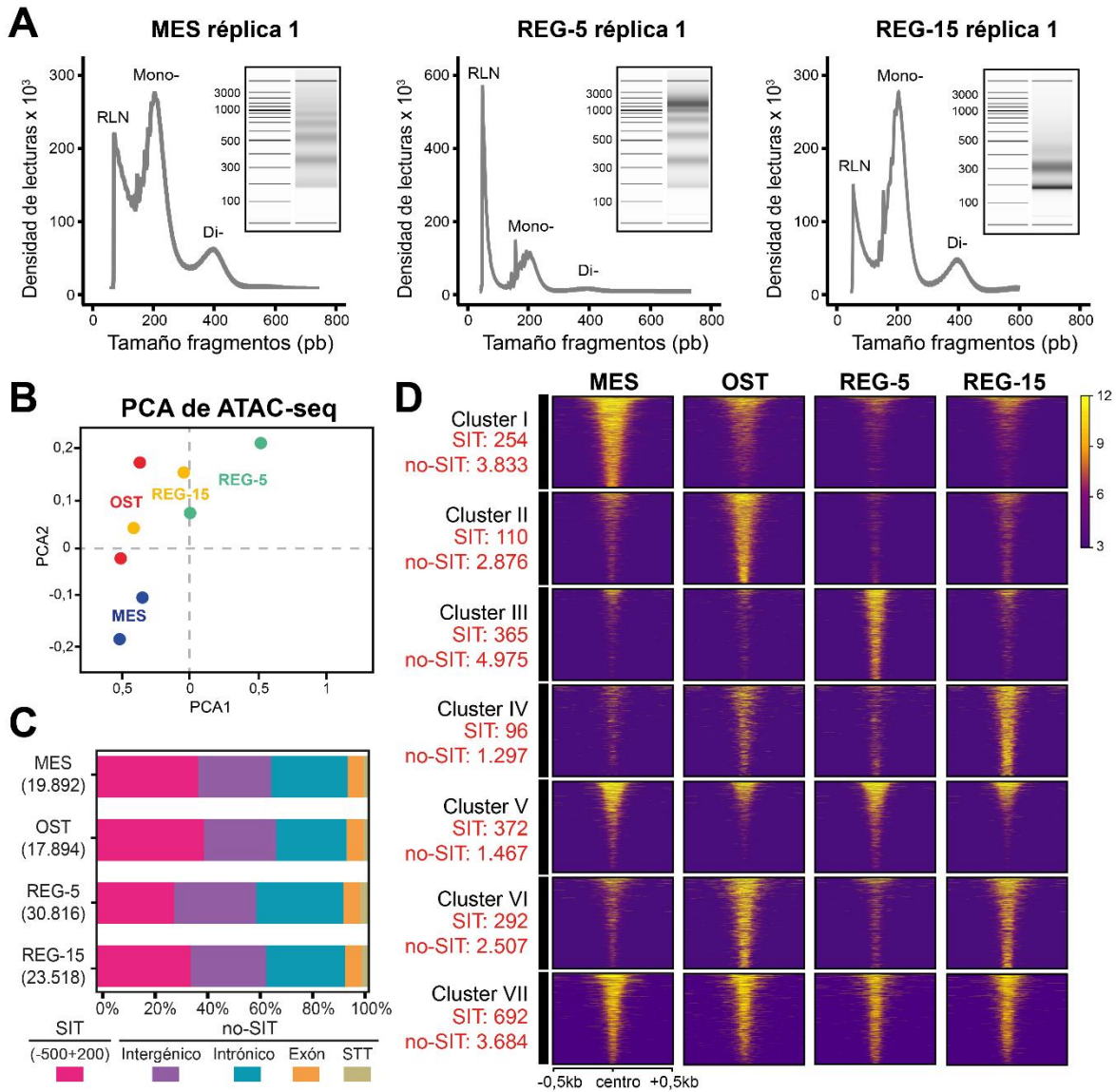


Figura 25. Validación y clusterización de regiones de cromatina abierta asociadas al desarrollo y a la regeneración craneal de *Xenopus tropicalis*. **(A)** Distribución del tamaño de los fragmentos para la primera réplica de las muestras de mesénquima (MES), regeneración 5dpl (REG-5) y regeneración 15dpl (REG-15). En los recuadros, se muestran las bandas obtenidas por Bioanalyzer de cada una de las librerías antes de ser secuenciadas. **(B)** Análisis de componentes principales (PCA), incluyendo el desarrollo óseo (MES y OST) y la regeneración ósea (REG-5 y REG-15). **(C)** Distribución genómica de los picos de ATAC-seq. Para cada muestra, se indica el número de picos validados por el puntaje de reproducibilidad (IDR). **(D)** Análisis de clusterización difusa de la señal de ATAC-Seq basado en el cálculo del puntaje de entropía. Los mapas de calor están centrados en los picos de cromatina abierta.

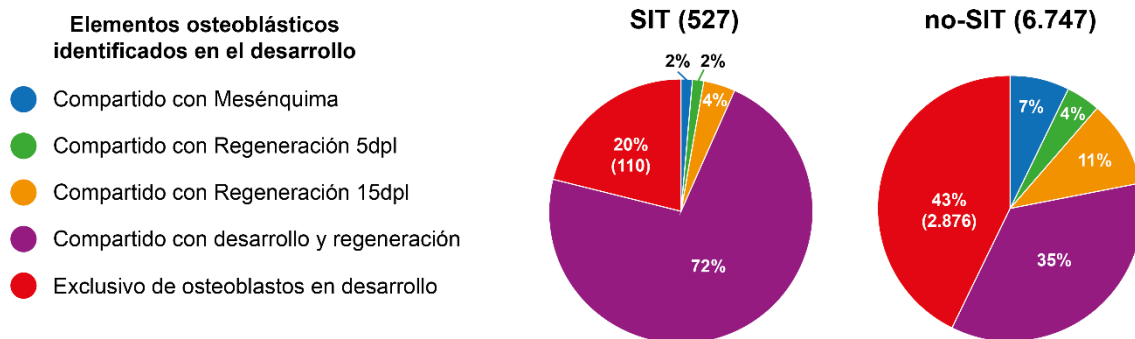


Figura 26. Proporción de regiones de cromatina abierta osteoblásticas identificadas en el desarrollo que también se encuentran presentes en el mesénquima osteogénico y en el tejido óseo regenerativo en fase temprana y tardía. El número de RLN que solo participan del desarrollo de osteoblastos (Clúster II) se encuentra apuntado en los gráficos de torta.

3.2.4. Sitios de unión a factores de transcripción enriquecidos en los clústeres de desarrollo y regeneración ósea de *Xenopus tropicalis*

Para identificar los factores de transcripción que controlan los procesos de desarrollo y regeneración ósea en fases tempranas y tardías, realizamos un análisis para evaluar el enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción en los RLN de los distintos clústeres (Figura 27). Interesantemente, observamos que el sitio AP-1, formado por heterodímeros Jun/Fos u homodímeros Jun/Jun, está enriquecido principalmente en clústeres comprendidos por muestras previas a la mineralización (Clúster I, III y V), así como en el Clúster VII. Por el contrario, la expresión de los transcritos de la familia Fos está sobre regulada exclusivamente en osteoblastos en desarrollo. Mientras los sitios NFAT y Twist están enriquecidos en elementos asociados al desarrollo temprano y tardío del hueso (Clúster I y II), los sitios NFI y Dlx, aumentan su frecuencia solo en los clústeres relacionados con la mineralización de la calvaria en desarrollo y regeneración (Clúster II, IV y VI), relacionándose directamente con la alta expresión de *nfic* y *dlx5* en OST y REG-15. En cuanto a los sitios Runx, estos están enriquecidos en RLN ubicuos de tejido esquelético (Clúster VII) y en muestras de desarrollo y regeneración tardía (Clúster II, IV y VI), representado por la sobre expresión de *runx2* en las muestras mineralizadas. Por otro lado, sitios de unión a Spi1 y TFEC, factores de transcripción involucrados en el desarrollo de macrófagos y neutrófilos, se encuentran altamente enriquecidos en la regeneración temprana (Clúster III), demostrando que varias de las células que se obtuvieron desde la muestra de REG-5 corresponden a células del sistema inmune reclutadas producto de la lesión (Figura 27). Este resultado puede ser comparado con los resultados de enriquecimiento Spi1 obtenidos en la muestra de hígado (Figuras 11 y 14).

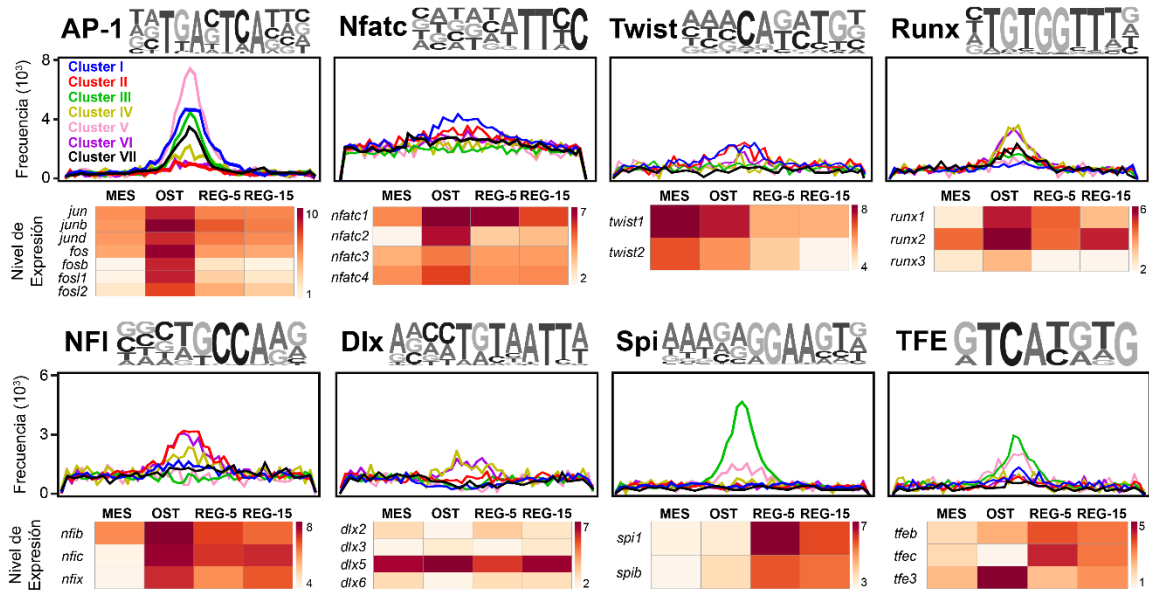


Figura 27. Enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción y su expresión en desarrollo y regeneración ósea. Los histogramas muestran la frecuencia de enriquecimiento de TFBS en cada clúster, mientras que los mapas de calor representan la expresión de los genes pertenecientes a la familia del factor de transcripción correspondiente. Sobre cada gráfico se muestra la secuencia consenso de cada TFBS.

3.2.5. Grado de conservación de secuencia con humano de las regiones de cromatina abierta asociadas a desarrollo y regeneración ósea de *Xenopus tropicalis*

Anteriormente determinamos que las RLN de osteoblastos exhiben un grado de conservación considerable en comparación con los tejidos blandos. Esto nos motivó a indagar sobre la conservación con humanos que poseen las secuencias de las regiones vinculadas al desarrollo temprano y la regeneración ósea. Para ello, utilizamos todas las RLN de los diferentes clústeres osteogénicos de *Xt* como secuencias *query* para realizar búsquedas de similitud mediante BLASTN en el genoma humano. Calculamos un factor de enriquecimiento, definido como el porcentaje de coincidencias obtenidas con cualquier tipo de RLN dividido por el porcentaje de coincidencias obtenidas con regiones aleatorias. Observamos que tanto para las regiones SIT como para las no-SIT, los Clústeres I y II muestran una conservación tres veces mayor que la de los datos aleatorios. Por otro lado, los Clústeres III y V exhibieron factores incluso inferiores a los determinados con RLN aleatorios. Sin embargo, los Clústeres IV y VI, asociados con la regeneración tardía, mostraron la aparición de elementos que nuevamente mantienen un grado de conservación con el genoma humano (Figura 28). En términos generales, los elementos en *cis*-específicos del desarrollo exhiben un alto grado de conservación. Aquellos que están presentes de manera ubicua en el tejido esquelético y aquellos que son específicos de la fase tardía de la regeneración, posiblemente

vinculados con la mineralización, muestran una conservación moderada. En contraste, los elementos de la fase temprana de la regeneración carecen de conservación.

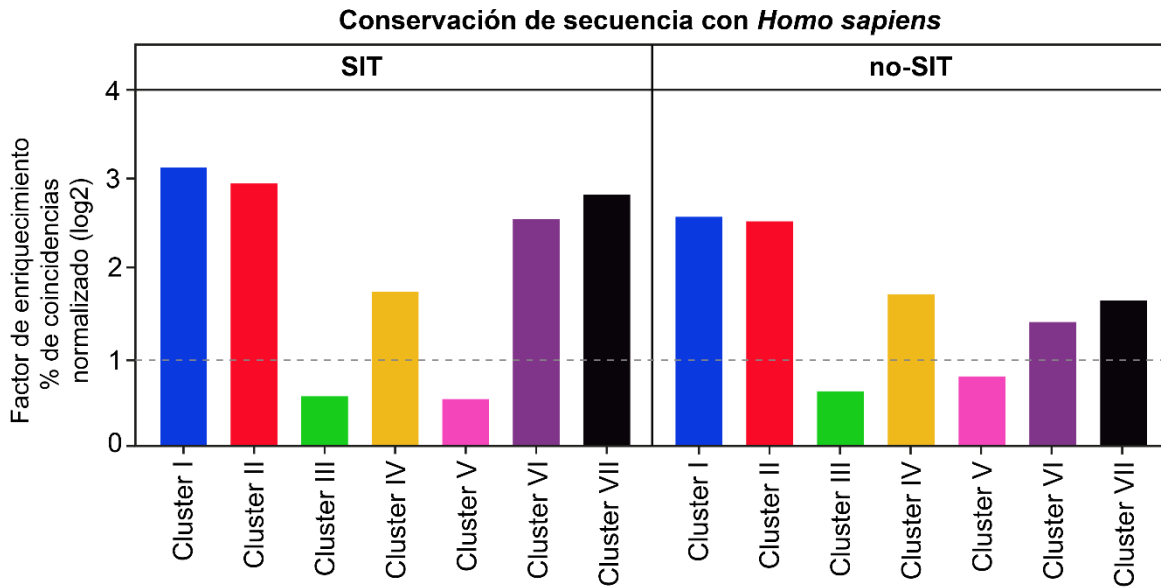


Figura 28. Conservación de secuencias de cromatina abierta osteogénicas de *Xt* con humano. El grado de conservación de los picos de *Xt* no-SIT o SIT de cada clúster se evaluó mediante BLASTN contra el genoma de *homo sapiens* (hg19). Los gráficos muestran en el eje y el factor de enriquecimiento en comparación con una selección de regiones aleatorias de *Xt*.

3.2.6. Integración de los datos obtenidos por RNA-seq y ATAC-seq: Identificación de enhancers putativos de regeneración y desarrollo del hueso de *Xenopus tropicalis*

Una vez caracterizados las RLN nos enfocamos en filtrar los loci de interés tanto para el desarrollo como para la regeneración ósea, y así identificar enhancers de regulación tisular (ERT). Para esto cruzamos los clústeres análogos establecidos por RNA-seq y ATAC-seq (i.e. Clúster 3 & Clúster III), identificando aquellos genes que cumplen tres requisitos: **i)** poseen una expresión diferencial, **ii)** presentan el promotor abierto y **iii)** poseen al menos un elemento en *cis*- específico cercano (enhancer putativo) para cada clase de Clúster (Figura 29, genes rojos). En general, los genes que tienen un enhancer putativo específico, presentan una mayor expresión y su promotor más abierto que aquellos que no tienen enhancers específicos cercanos (Figura 29, diagramas de caja). Las únicas excepciones son los genes de los Cluster 1 y 4 (Figura 29B, E).

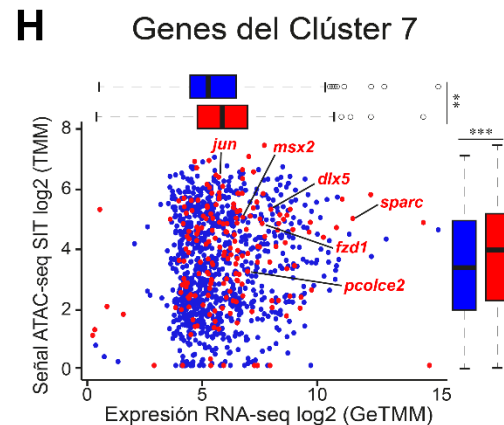
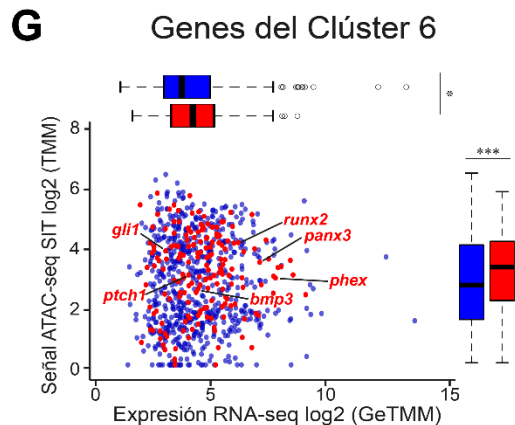
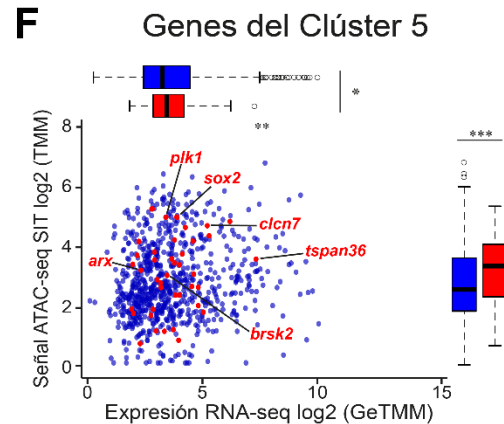
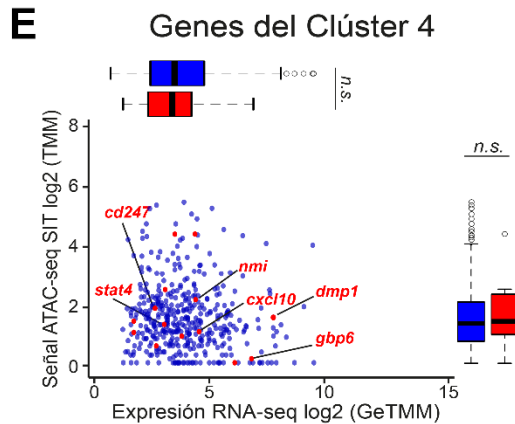
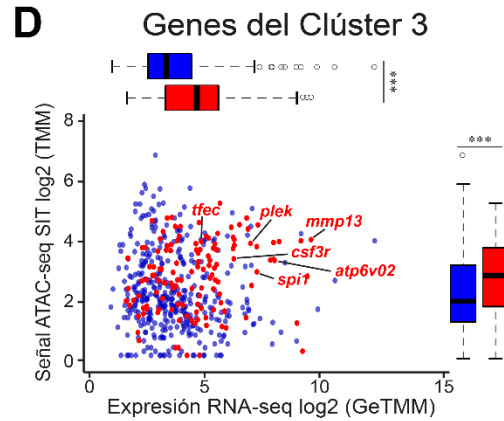
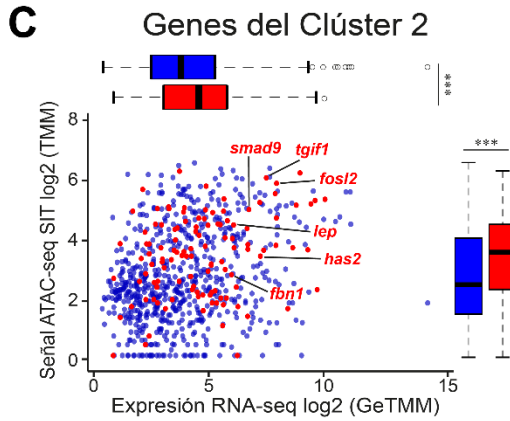
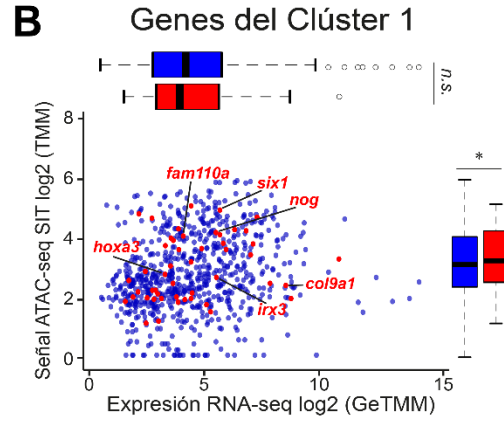
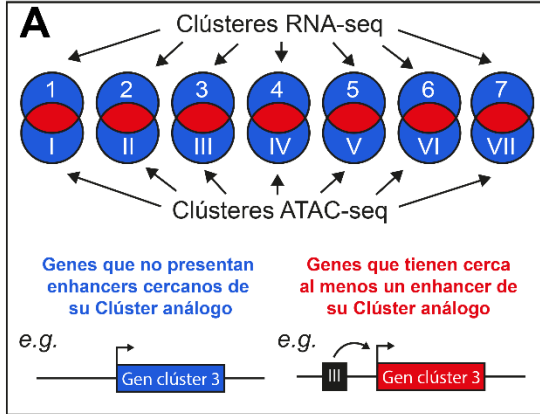


Figura 29. Integración de los resultados de RNA-Seq y ATAC-Seq. Gráficos de dispersión que comparan los niveles de expresión (GeTMM) y la señal de ATAC-Seq en los promotores (-500 a +200 pb) de cada gen clusterizado por RNA-Seq. Los puntos rojos representan todos aquellos genes que muestran uno o más elementos reguladores específicos cercanos pertenecientes al clúster de ATAC-Seq análogo al de RNA-Seq. Los puntos azules representan todos aquellos genes que no tienen un pico específico de ATAC-Seq cercano. Cada Clúster presenta diagramas de caja para representar la cuantificación de la señal SIT del ATAC (cajas verticales) y la expresión de los transcritos (cajas horizontales), siguiendo la clave de color de los puntos. Para el análisis estadístico, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y se aplicó la corrección de Bonferroni para ajustar los valores de p (* <0,5; ** <0,1; *** <0,01).

Con el fin de ilustrar los resultados de integración, para cada clúster se seleccionaron algunos genes representativos y sus respectivos enhancers (Figuras 29 y 30), añadiendo el ATAC-seq y RNA-seq de la muestra de hígado como control (Figura 30). En el caso del Clúster 1, asociado a la formación temprana del cráneo (Clúster 1), destaca la presencia de *irx3* y *rflna*, genes que participan en el desarrollo embrionario del esqueleto [211], [212], y *nog*, un antagonista de la vía BMP [213] (Figuras 29B y 30A). Dentro de los genes asociados al desarrollo tardío del cráneo (Clúster 2), sobresale *lep*, *fosl2* y *tgif1*, involucrados en el metabolismo y la mantención de la homeostasis del hueso [214], [215], [216] (Figuras 29C y 30B). En cuanto a los genes relacionados con la regeneración temprana del cráneo (Clúster 3), emerge por un lado *mmp13* y *atp6vd02* [217], [218], que promueven la remodelación del hueso, y por otro *spi1*, que codifica para un factor de transcripción importante en el desarrollo de células mieloides (Zakrzewska et al., 2010). Cabe destacar que el enhancer asociado a *spi1*, se encuentra presente solo en la muestra de regeneración 5dpi, y no está en hígado (Figura 30C). La regeneración tardía (Clúster 4), es decir cuando la región de la herida ya está mineralizada, sobre expresa el gen de osteocitos *dmp1* [109] y algunos genes de inflamación como *cxcl10* [220] (Figura 30D). Se identificó un enhancer putativo de *sox2*, que podría estar controlando la expresión de este gen en el tejido óseo no mineralizado (Clúster 5) (Figura 30E). Dentro de los genes asociados a tejido óseo mineralizado (Clúster 6), destaca la presencia de enhancers que controlan *phex* y *runx2*, cuyo silenciamiento provoca fenotipos con deficiencia de mineral en el esqueleto [117], [221] (Figura 30F). Finalmente, se identificó un enhancer putativo que controla *dlx5*, el cual se encuentra presente en el tejido esquelético tanto en el desarrollo como en procesos de regeneración y que no se encuentra en hígado (Clúster 7) (Figura 30G).

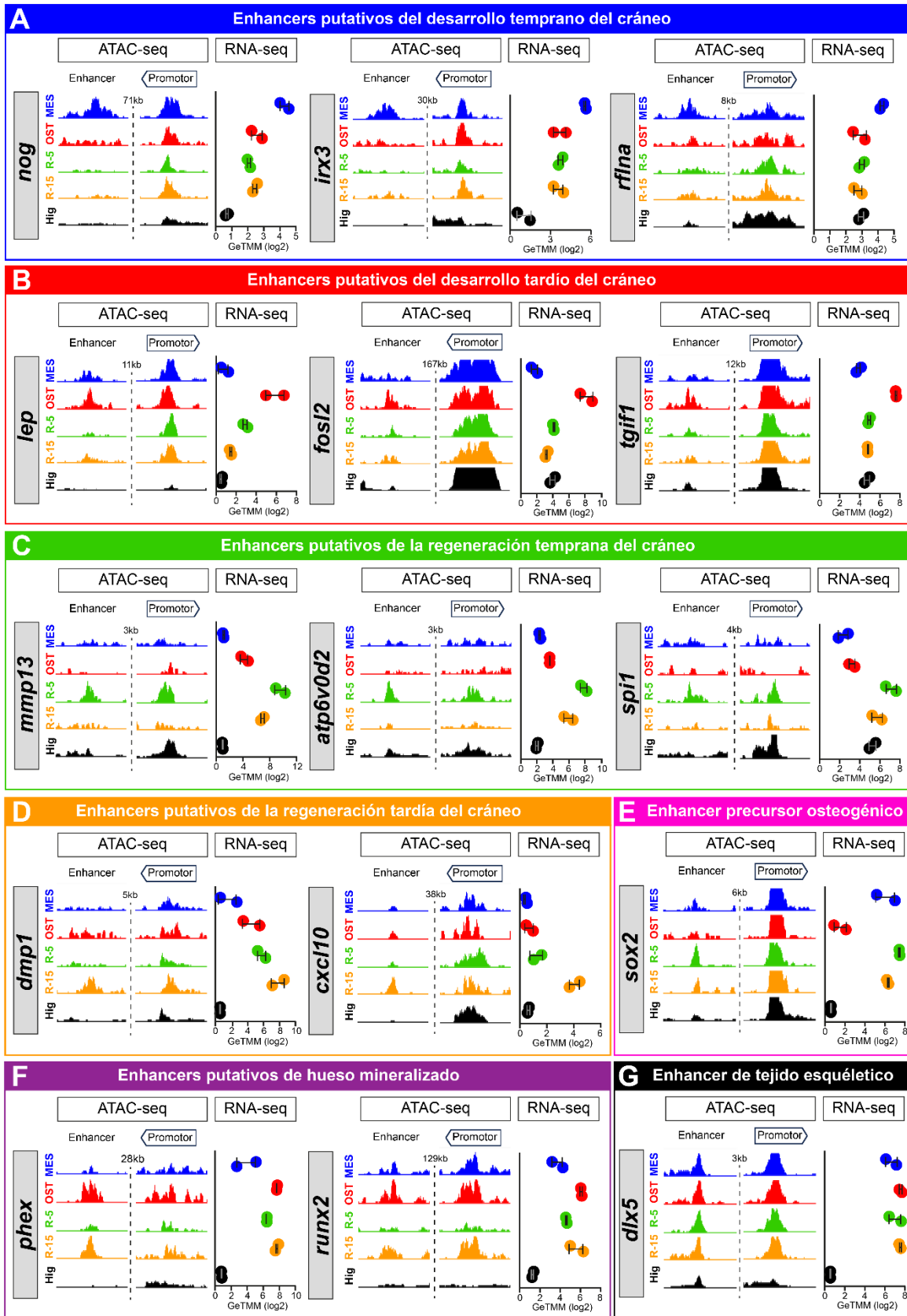


Figura 30. Perfiles de cromatina abierta y expresión de genes seleccionados mediante la integración de los resultados de ATAC-seq y RNA-seq. Para cada clúster se seleccionó un gen y un enhancer putativo: Clúster 1 **(A)**, Clúster 2 **(B)**, Clúster 3 **(C)**, Clúster 4 **(D)**, Clúster 5 **(E)**, Clúster 6 **(F)**, Clúster 7 **(G)**. Los perfiles de ATAC-seq están dispuestos en ventanas de 1kb, exhibiendo a la izquierda la señal del enhancer putativo y a la derecha la señal del SIT. La distancia entre ambas regiones está denotada sobre la línea punteada y la dirección que tiene el gen respecto al enhancer se encuentra ilustrada con la flecha que encierra la palabra promotor. Los diagramas de puntos indican los niveles de expresión normalizada de las réplicas de RNA-seq de cada muestra. Se añadieron los resultados de ATAC-seq y RNA-seq de hígado como control (Hig.).

3.2.7. Participación de *dlx5* y *sox2* en el desarrollo y la regeneración ósea

3.2.7.1. *dlx5*

Una vez realizada la integración de los datos de RNA-seq y ATAC-seq, el gen que codifica para *dlx5* nos llamó la atención puesto que además de presentar una sobre expresión en el tejido esquelético, aparentemente su transcripción es controlada por un elemento distal común tanto en desarrollo como en regeneración de hueso (Figura 29G y 30A), lo que nos llevó a analizar en detalle la secuencia y expresión de este gen. Primeramente, para respaldar los resultados de ATAC-seq y RNA-seq, examinamos los perfiles de las distintas marcas de CHIP-seq obtenidas en osteoblastos primarios, observando que en el promotor de este gen hay altos niveles de marcas de histonas activadoras, como lo son H3K4me3 y H3K27ac, y una depleción de la marca represiva H3K27me3 (Figura 31A). A nivel de secuencia, el promotor de *dlx5* tiene un alto grado de identidad con humano, presentando sitios de unión conservados para Nfi, Dlx y Runx (Figura 31A, B), factores de transcripción cuyas secuencias de unión están enriquecidas principalmente en los elementos en *cis*- asociados a desarrollo y regeneración tardía (Figura 27).

Con el objetivo de entender el patrón de expresión de *dlx5* en calvaria en regeneración, realizamos ensayos de hibridación *in situ* en cortes de calvaria de *Xenopus tropicalis* en proceso de regeneración 15dpl. Para identificar las estructuras del tejido, efectuamos una tinción de hematoxilina eosina, en la cual diferenciamos el hueso regenerado del hueso viejo. Este último tiende a encontrarse doblado en el borde de la herida producto del ingreso del microtaladro. Se reconocen osteoblastos alrededor de toda la matriz y algunas lagunas de osteocitos vacías en la zona del trauma. Cabe destacar que el hueso regenerado se halla rodeado de un grupo de células mesenquimáticas (Figura 31C, D). Mientras la sonda sentido no presentó señal (Figura 31E), se detectó una fuerte expresión de los controles positivos *col1a1* y *sparc*, y de *dlx5*, en osteoblastos, osteocitos y células mesenquimáticas (Figura 31F, G, H).

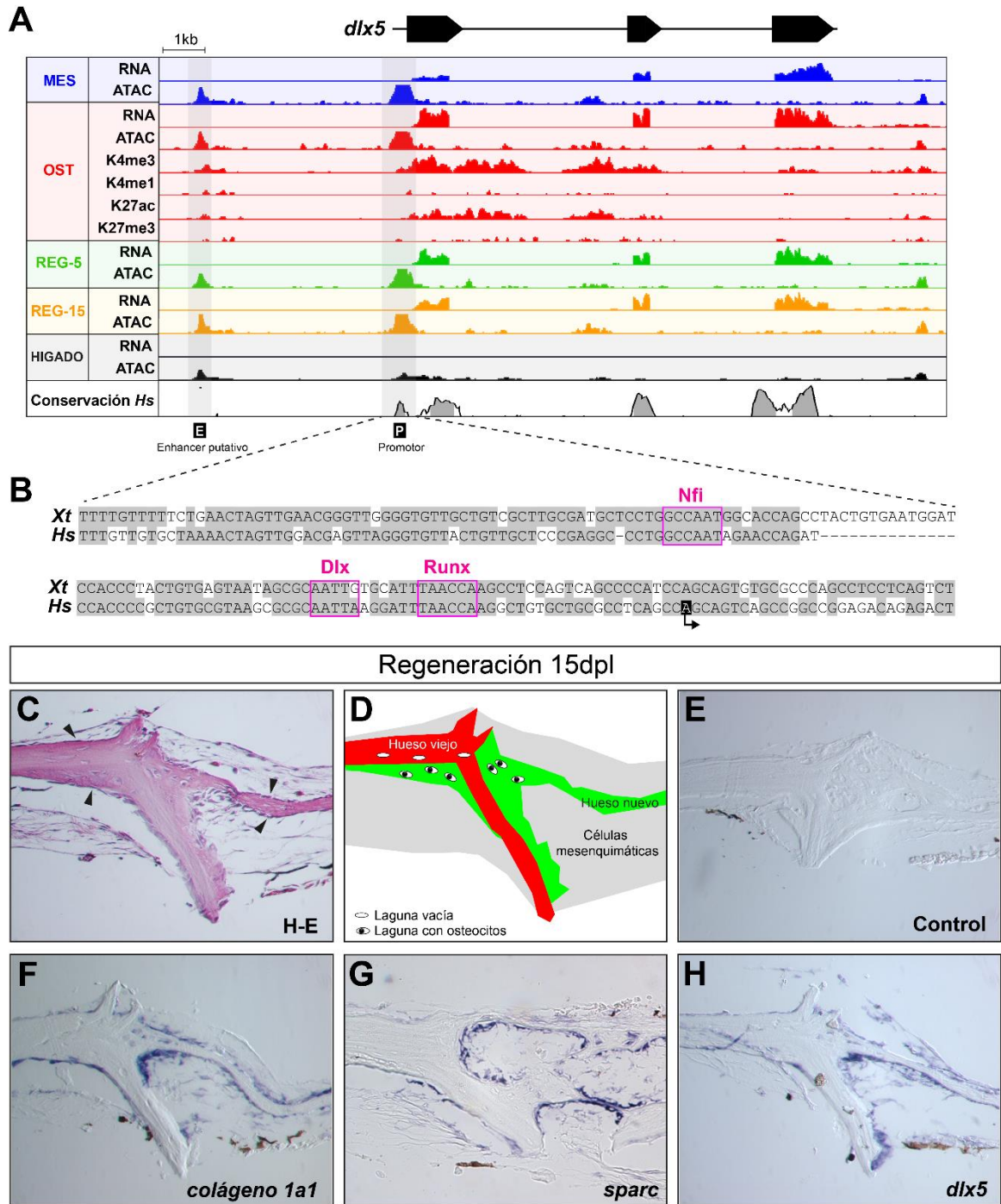


Figura 31. Expresión, regulación y conservación de *dlx5* en tejido esquelético. **(A)** Perfiles de la señal ATAC-seq, RNA-seq, ChIP-seq y conservación con humano del locus *dlx5* para mesénquima, osteoblastos, regeneración 5dpl, regeneración 15dpl e hígado. **(B)** Alineamiento de secuencia de la región promotora de *dlx5* entre *Xenopus tropicalis* y *Homo sapiens*. **(C)** Tinción de hematoxilina-eosina de cortes histológicos ubicados en la zona de transición entre el hueso "viejo" y "nuevo" (regenerado 15dpl). **(D)** Ilustración esquemática de (C). El hueso recién formado (verde) entra en contacto con la matriz del calvaria dañada (rojo), donde se encuentran lagunas osteocíticas vacías.

Los osteoblastos cubren la superficie de la matriz ósea tanto antigua como nueva (puntas de flecha en C). Alrededor del hueso recién formado se observa tejido mesenquimático. Se realizó hibridación *in situ* utilizando una sonda de control (E) o sondas específicas para los genes de *col1a1* (F), *sparc* (G) y *dlx5* (H). La parte dorsal está arriba en todos los paneles.

3.2.7.2. *sox2*

El siguiente paso consistió en identificar los genes involucrados en la formación de la masa de células mesenquimáticas que se diferencian en osteoblastos para mineralizar la herida ósea después de la lesión. Este enfoque nos llevó a centrarnos en el Clúster 5, específicamente en *sox2*, un gen que se expresa en el mesénquima, pierde su expresión en osteoblastos, pero que recupera un alto nivel de expresión durante la regeneración temprana después de la lesión (Figura 32A). Aunque la transcripción de *sox2* disminuye ligeramente en REG-15, sigue estando presente en las células mesenquimáticas que rodean el hueso nuevo (Figura 32A). A nivel de la cromatina, el promotor está abierto en todas las muestras esqueléticas; sin embargo, se destaca un elemento distal que se encuentra 6kb río arriba del sitio del SIT y que está abierto en MES y REG-5, pero cerrado en osteoblastos, lo que sugiere que actúa como un enhancer putativo de *sox2*, siendo posible catalogarlo como un enhancer de regeneración tisular (ERT) (Figura 32A). Por el contrario, una región 160kb río abajo del SIT de *sox2*, además de mostrar una señal ATAC específica para osteoblastos, presenta altos niveles de la marca represiva H3K27me3 en este tipo celular (Figura 32A), lo que sugiere la presencia de un silenciador.

Si bien el silenciador putativo muestra un alto grado de conservación con el genoma humano (Figura 32A, C), esta región en los osteoblastos humanos se encuentra cerrada (Figura 32B). Adicionalmente, si analizamos en detalle la secuencia del silenciador, se observa que el sitio de unión del represor REST presente en la rana, difiere en un nucleótido con respecto a la secuencia del *Homo sapiens* (Figura 32C).

Para confirmar la presencia de la proteína Sox2 en el tejido en regeneración, realizamos un western blot exclusivamente de la zona de regeneración 5dpl y de muestras de hueso adyacente a la herida. Sobre esto, observamos que Sox2 se expresa a mayor nivel en el tejido regenerativo no mineralizado que en el hueso (Figura 32D). Por otro lado, se ha reportado que Sox2 promueve la proliferación en distintos tipos celulares indiferenciados [222], [223], por lo que realizamos ensayos de inmunofluorescencia de fosfohistona H3 (pH3), un anticuerpo que marca células en proceso de división. A través de este experimento detectamos que en REG-5, existe una cantidad significativamente mayor de células proliferativas en comparación a REG-15 y al hueso adyacente a la herida (Figura 32E).

En resumen, se han identificado los elementos regulatorios en *cis*- que podrían estar controlando la activación y represión de *sox2* en el proceso de diferenciación de células mesenquimáticas a osteoblastos tanto para el desarrollo como para la regeneración del cráneo.

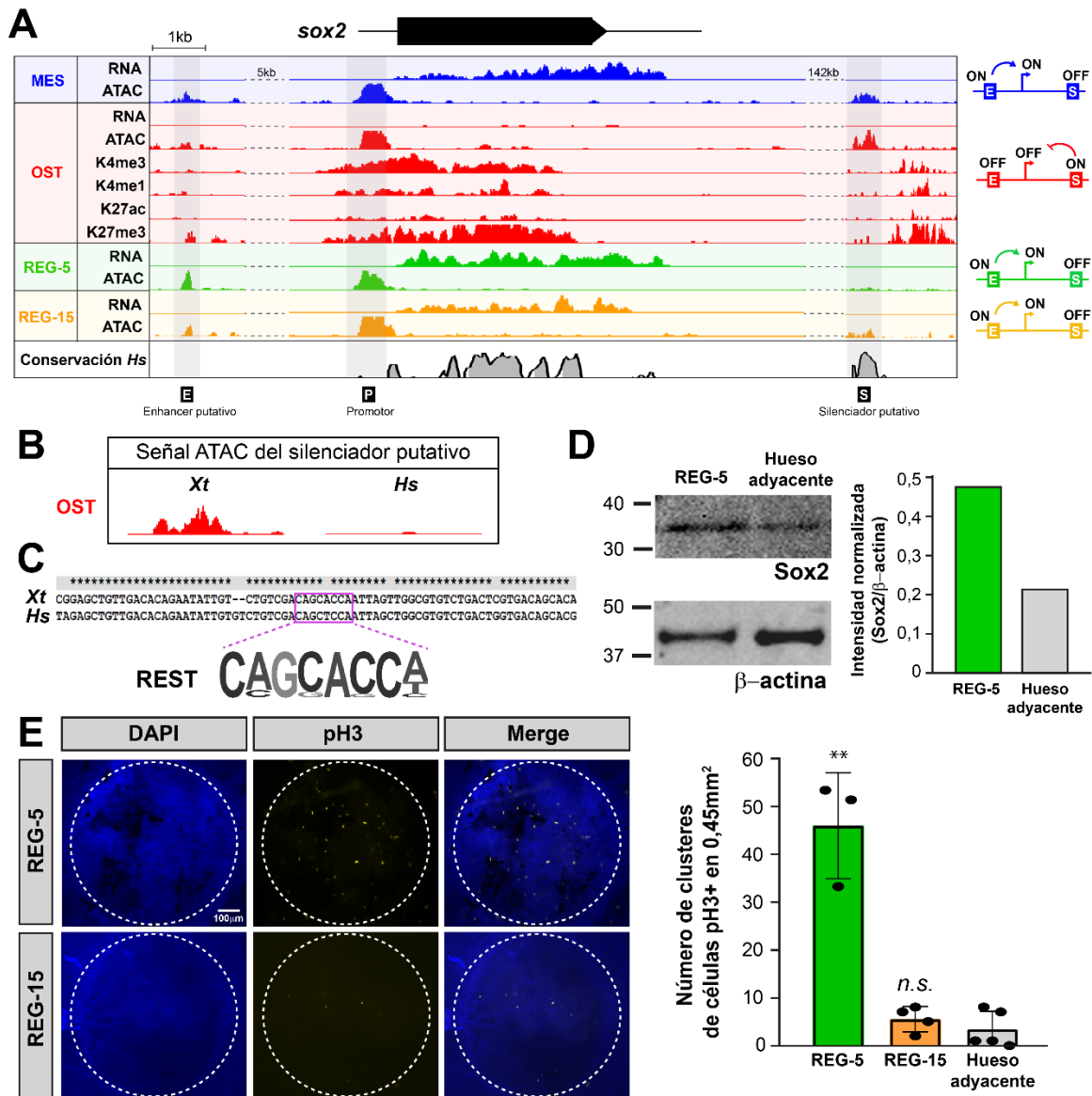


Figura 32. Regulación transcripcional de *sox2* y proliferación celular de la zona de regeneración. **(A)** Perfiles de la señal ATAC-seq, RNA-seq, ChIP-seq y conservación con humano del locus *sox2* para mesénquima, osteoblastos, regeneración 5dpl y regeneración 15dpl. **(B)** Señal ATAC-seq de *Xenopus tropicalis* y *Homo sapiens* de la región asociada al silenciador putativo de *sox2*. **(C)** Alineamiento de secuencia del silenciador putativo de *sox2* entre *Xt* y *Hs*. **(D)** En el panel izquierdo se presenta el análisis de Western blot de la proteína Sox2 presente en la zona de regeneración 5dpl y en el hueso adyacente a la herida. Se utilizó b-actina como control de carga. En el panel derecho se muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas. **(E)** En el panel izquierdo se observa la inmunofluorescencia para identificar células en proliferación mediante el uso de anti-pH3 tanto para REG-5 como para REG-15. Las imágenes fueron capturadas en una vista dorsal de la calvaria

lesionada y la línea punteada delimita la herida. En el panel derecho se muestra la cuantificación del número de clústeres de células pH3 positivas, usando como control el hueso adyacente a la herida. Se empleó una prueba de t de Student para el análisis estadístico (valores de p : ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; n.s., no significativo).

4. DISCUSIÓN

4.1 Sobre la naturaleza de las muestras

Como los osteoblastos primarios se obtuvieron utilizando un protocolo de extracción previamente establecido [160], no es sorprendente que estas células, tanto para el ATAC-seq como para el RNA-seq, proporcione una señal específica respecto a la ontología génica (Figuras 11C y 24C), el enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción (Figuras 14 y 27), y los fenotipos en mamíferos asociados con picos SIT y no-SIT conservados (Figura 20). En contraste, la composición celular de todos los otros tejidos utilizados en este estudio es menos controlada.

Respecto a las muestras obtenidas desde tejidos control, la ontología génica y el enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción sugieren que el corazón y el hígado contienen principalmente glóbulos rojos y blancos, por sobre cardiomiocitos y hepatocitos, respectivamente (Figuras 11C y 14). Por otro lado, el pulmón es el tejido más desconcertante, ya que exhibe características únicas que no son fáciles de interpretar. Por ejemplo, su perfil nucleotídico se asemeja al de los elementos ubicuos (Figura 13) y sus patrones de conservación con otros genomas están entre los más altos (Figura 18). Esto podría deberse a que las RLN específicas del pulmón son muy pocas, lo que podría generar un sesgo en el cálculo (Figura 11A), por otro lado, las RLN específicas del pulmón están enriquecidas en sitios de unión a factores de transcripción para HNRNP-K, que es un factor de transcripción involucrado en la regulación de células madre y la regeneración pulmonar [224], y se encuentran cerca de algunos genes conocidos por desempeñar un papel en las células madre de los alveolos y otros tejidos como *Idr5*, *pdgfra* y *plin2*. Esto sugiere que nuestro protocolo de disociación de alguna manera condujo a un enriquecimiento parcial en células madre pluripotentes del pulmón [225].

Por otra parte, las muestras osteogénicas distintas a los osteoblastos también representan mezclas complejas de células. Si bien el tejido mesenquimático de desarrollo temprano de cráneo está enriquecido en células precursoras osteogénicas, además tiene asociadas células pigmentadas [160] que difícilmente se pueden disociar de la membrana craneal, quedando reflejado en los términos GO relacionados con cromóforos (Figura 24C). Basados en los TFBSs (Figura 27), GO (Figura 24C) y la integración de los resultados de ATAC-seq y RNA-seq (Figuras 29 y 30), sugerimos que la población celular obtenida desde zona de regeneración temprana REG-5, está compuesta por tres grupos de células principales: **i)** Precursores osteoblásticos, **ii)** Osteoclastos y **iii)** Sistema inmune, mientras que la muestra de regeneración tardía REG-15, al ser obtenida de toda la zona, presenta osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, precursores y células del sistema inmune provenientes del grupo celular similar a un blastema que recubre la herida.

En conclusión, aunque la composición celular exacta de los tejidos control sigue siendo inexplorada, los datos obtenidos aquí demuestran que cumplieron su función y nos permitieron identificar RLN específicos de osteoblastos y ubicuos. Por otra parte, la integración de los datos de secuenciación

masiva nos permitió, en el caso de las muestras de regeneración ósea y desarrollo temprano de hueso, reconocer de manera general los grupos celulares que las componen.

4.2 La arquitectura de las RLN ubicuas difiere de las tejido-específicas

Aunque este trabajo está enfocado en el reconocimiento del paisaje regulatorio de hueso en desarrollo y regeneración, no podemos soslayar el hecho de que la utilización de los tejidos control nos permitió identificar RLN ubicuas de *Xenopus tropicalis*, las cuales exhiben algunas características que difieren de los tejido-específicos. Por ejemplo, los promotores ubicuos de *Xt* tienen un claro sesgo-GC (Figura 13B) [17], tienen un contenido de CpG más alto (Figura 13A) y controlan genes relacionados con funciones celulares vitales (Figura 11C) (Saxonov et al., 2006; Yang et al., 2014). Además, están enriquecidos en TFBSs para los factores de transcripción ETS, SP y E2F6, conocidos por unirse al SIT de genes ampliamente expresados (Figura 14) [191], [192], [193]. Adicionalmente, los RLN no-SIT ubicuos están enriquecidos en TFBS tanto para CTCF como para MAZ, sugiriendo que muchos de ellos actúan como insuladores [39], [40]. Las regiones distales específicas de osteoblastos muestran algún enriquecimiento de CTCF, lo que podría corresponder a insuladores específicos de este tipo celular [228]. El hecho de que estos sitios CTCF estén predominantemente enriquecidos en regiones no conservadas (Anexo 5) sugiere que los insuladores específicos del hueso son evolutivamente más inestables que los enhancers, y, por lo tanto, que los dominios cromatínicos específicos de los osteoblastos podrían mostrar una variación sustancial entre la rana y el ser humano. Finalmente, mientras que los RLN distales ubicuos están principalmente ubicados en las cercanías del promotor que controlan, la ubicación distal de los enhancers específicos del tejido de *Xt* se asemeja a la distribución de los enhancers del desarrollo (Figura 11B) [229], en consistencia con la idea de que se requieren arquitecturas regulatorias más complejas para generar patrones de expresión específicos.

Un enriquecimiento del consenso de caja TATA en los SIT ubicuos de *Xt* (Figura 14) claramente representa la característica más divergente con los mamíferos, donde está asociado con genes que muestran patrones de expresión tejido-específicos [189]. Siendo la caja TATA el único motivo promotor conservado en todos los genomas eucariotas examinados hasta la fecha, resulta sorprendente que contribuya a diferentes clases de promotores en anfibios y mamíferos. Este cambio en el uso de la caja TATA podría haber sido impulsado por la evolución de diferencias en la composición de nucleótidos en estos linajes de vertebrados [12].

4.3 Las marcas de histonas validan enhancers y silenciadores osteoblásticos

Las regiones de cromatina abierta con una localización distal que fueron detectadas por ATAC-seq no están obligatoriamente relacionadas con activación transcripcional, siendo posible tener una mezcla de enhancers, silenciadores e insuladores [71], [230]. Una mayor expresión de los genes adyacentes a estas regiones sugiere que la selección de RLN diferenciales y la clusterización filtra

estos elementos obteniendo un enriquecimiento de enhancers transcripcionales (Figuras 15A y 30). Más en detalle, es probable que aquellas regiones que no siguen el patrón de expresión de la mayoría de los elementos diferenciales y que se encuentran cercanas a genes con baja expresión actúen como insuladores, silenciadores o incluso puedan potenciar la transcripción de genes lejanos. En el caso específico de los osteoblastos, las marcas de histonas obtenidas a través de ChIP-seq, nos permitieron asociar las RLN específicas con características activadoras o silenciadoras. Al igual que con la correlación RNA-seq, tanto para los elementos SIT como no-SIT, la gran mayoría de las regiones osteoblásticas mostraron marcas activadoras (H3K4me3 para promotores y H3K27ac para enhancers), mientras que solo un 8% de los promotores y un 2% de los elementos distales exhibieron una fuerte marca represiva H3K27me3 (Figuras 16 y 17). Interesantemente, los elementos distales con este patrón de marcas están cercanos a genes con baja expresión y son los únicos enriquecidos en sitios para el represor REST, lo que valida su clasificación como silenciadores (Figura 17). Es importante destacar que la identificación de este grupo de silenciadores putativos en osteoblastos, aunque pequeño, es un hallazgo relevante, ya que, en comparación con la cantidad de investigaciones sobre enhancers, la búsqueda de silenciadores no es tan común, habiendo solo algunos trabajos que se enfocan en buscar regiones de cromatina abierta marcadas con H3K27me3 que se correlacionan negativamente con la expresión génica [36], [231], [232].

4.4. Conservación global de regiones regulatorias

Nuestro análisis comparativo (Figura 18) reveló una serie de características notables que son consistentes con un conjunto de literatura publicada sobre otras especies de vertebrados. Primero, encontramos que las regiones SIT suelen estar mejor conservadas que las regiones distales, una situación que también se ha observado entre especies de mamíferos [57], [233]. Como ejemplo, al compararse con el genoma humano, las regiones SIT siempre arrojan un mayor porcentaje de coincidencias y factores de enriquecimiento más altos que las regiones distales (compare la posición relativa de los círculos y cuadrados grises en la Figura 18). Segundo, los elementos reguladores identificados en *Xt*, así como las regiones aleatorias, se alinean aproximadamente el doble al subgenoma L de *Xenopus laevis* que al subgenoma S, lo cual es consistente con el hecho de que el subgenoma S es particularmente propenso a las deleciones y ha divergido significativamente [203]. Tercero, *Danio rerio* muestra uno de los genomas más divergentes, a menudo mostrando valores de enriquecimiento inferiores a los obtenidos al comparar los genomas de especies más remotamente relacionadas como el tiburón elefante, la lamprea o incluso el anfibio. Cuarto, algunas RLN muestran puntajes de enriquecimiento que son más bajos de lo esperado por azar, una situación que es particularmente evidente al comparar las regiones específicas del hígado en el genoma de la lamprea (Figura 18). Dado que la muestra de hígado permitió la detección de promotores y enhancers linfocíticos de *Xt* (Figuras 11 y 14), el grado general de baja conservación que observamos podría reflejar una tasa de divergencia rápida para la red regulatoria génica inmune de los vertebrados

desde su origen hace más de 500 millones de años [234]. Esta idea es consistente con la ausencia de conservación para un enhancer de macrófagos en el locus *csf1r* [235]. Quinto, el conjunto de enhancers específicos del pulmón se alinea notablemente bien con el genoma del anfibio (Figura 18), a pesar de que esta especie carece de pulmones. Esta observación podría reflejar una conservación de enhancers relacionados con la función de células madre, una hipótesis respaldada por un estudio que examinó el proceso de regeneración en el anfibio [236].

4.5. Una lógica regulatoria bien conservada para los enhancers de osteoblastos en desarrollo
Es notable que muchos de los sitios de unión a factores de transcripción enriquecidos en los RLN relacionados con la formación de hueso de *Xt* están vinculados a reguladores osteogénicos clave de mamíferos, como AP-1, TEAD, RUNX2, NFIC, TWIST1/2 y NFAT (Figuras 14 y 27) [124], [195], [196], [197], [198], [216], [237], lo que refleja una lógica regulatoria altamente conservada para la osteogénesis a nivel de los tetrápodos. Tal enriquecimiento de TFBSs es válido tanto para RLN osteoblasto-específicas de *Xt* conservadas como para aquellas que carecen de conservación de secuencia con los humanos (Anexo 5), lo que demuestra que los enhancers osteoblásticos han mantenido una gramática regulatoria bien conservada a pesar de una extensa divergencia de secuencia, un fenómeno observado en distintos grupos animales y diversos contextos biológicos [238], [239].

Aunque las proteínas TWIST1 y 2 han sido principalmente reportadas para retrasar el proceso de diferenciación de manera post-traduccional, uniéndose a RUNX2 para reprimirlo [197], un estudio mostró que TWIST1 también reprime directamente el promotor *c-ros-1*, regulando negativamente la diferenciación osteogénica [240]. En este sentido, el enriquecimiento reportado en los sitios de unión de TFBS de TWIST1/2 (Figuras 14 y 27) representa la primera evidencia de que las proteínas TWIST podrían controlar el tiempo de diferenciación osteoblástica mediante la unión a cientos de enhancers osteogénicos, una posibilidad que podría confirmarse mediante ChIP-Seq. La única novedad dentro de los factores de transcripción que se unen a los promotores osteoblasto-específicos parece ser TFIIIA, que controla la transcripción de genes ribosomales asociados con el promotor Pol-III en *Xenopus laevis* [241]. Por lo tanto, según nuestro trabajo, TFIIIA también podría regular promotores Pol-II de *Xt* durante la osteogénesis.

Muchas de las RLN osteoblasto-específicas de *Xt* que además tienen marca activadora se encuentran cerca de genes que codifican para activadores osteogénicos cuyos TFBS están enriquecidos en nuestro conjunto de datos (Figuras 14 y 27, Anexo 3), como es el caso de *nfatc1*, *nfatc2*, *nfatc4*, *tead1*, *nfia*, *nfib* y *runx2*. Este alto grado de consistencia entre el enriquecimiento de TFBSs y la ubicación de las RLN sugiere que los bucles de retroalimentación positiva conservados yacen en el núcleo de la red de regulación génica osteogénica.

4.6. Identificación de enhancers y promotores osteogénicos relevantes para la biología humana

Informamos de 162 promotores y enhancers que muestran una RLN específica de osteoblastos en *Xt* y cuyas regiones ortólogas se superponen con un pico de ATAC-Seq en osteoblastos humanos (Figura 19). El hecho de que 263 regiones conservadas carezcan de un pico de ATAC-Seq en humanos podría deberse a diferencias celulares, ya que los osteoblastos humanos se obtuvieron mediante diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales [207], mientras que nosotros utilizamos osteoblastos primarios de rana [160]. Esta posibilidad se apoya en un estudio que muestra que los condrocitos derivados de células madre mesenquimales son epigenéticamente bastante distintos de los condrocitos primarios [242]. Esta diferencia también podría resultar de una divergencia evolutiva. Si consideramos que los enhancers osteoblásticos son relativamente pleiotrópicos [243], uno podría imaginar que las mutaciones pueden atenuar su actividad en el hueso, mientras mantienen su función en otros tejidos, contribuyendo así a un cambio considerable en el paisaje regulatorio. Sin embargo, favorecemos la primera posibilidad porque los análisis de GREAT y los datos de GWAS revelan términos íntimamente conectados con fenotipos esqueléticos de mamíferos, independientemente de si las regiones homólogas en humanos contienen o no un pico de ATAC-Seq osteoblástico (Anexo 7) [244]. En resumen, la combinación de ATAC-Seq, RNA-Seq, ChIP-Seq, produjo resultados altamente consistentes que llevaron a la identificación de 425 elementos regulatorios conservados relevantes para la biología esquelética humana. Realizar ensayos de reporteros y mutagénesis de enhancers en osteoblastos humanos, así como en modelos de rana y ratón, mejorará nuestra comprensión de los mecanismos de regulación que controlan la expresión de genes involucrados en el desarrollo óseo y patologías (Anexo 6). En este sentido, un estudio reciente demostró que el enhancer *trps1* conservado (correspondiendo exactamente al RLN número 27 identificado en este trabajo de tesis, ver Figura 19 y Anexo 6) potencia la expresión en aletas pectorales en ensayos de reporteros en embriones de pez cebra [245].

4.7. Aclaraciones del modelo de lesión craneal

El diámetro del microtaladro utilizado fue de 0,5mm que corresponde entre un 11-12% del área total de la calvaria. En el caso de los ratones, se ha determinado que el tamaño crítico de una lesión craneal corresponde a 4-5mm, es decir, que, sobre ese diámetro, el organismo no es capaz de regenerar de manera espontánea el hueso perdido [246], [247]. Si tenemos en cuenta que 4mm representa un 12-15% del área del cráneo (frontal, parietal e interparietal), entonces nuestro ensayo provoca una herida de un tamaño que en mamíferos no podría ser regenerada de manera natural o demoraría demasiado, lo que confirma un potencial regenerativo mayor en anfibios.

Una desventaja de utilizar un microtaladro es que el impacto en el hueso provoca que este se doble hacia el interior, dejando algunos residuos de hueso viejo que afectan levemente el análisis histológico (Figuras 23 y 31). Una opción sería utilizar una trefina quirúrgica, cuya punta es circular

y hueca, permitiendo sacar el trozo de hueso necesario sin generar un efecto mecánico tan profuso en los bordes de la lesión [147], [246].

4.8. La utilidad de la clusterización e integración de los resultados ATAC-seq y RNA-seq

La identificación de genes con una expresión diferencial o la determinación de regiones de cromatina abierta específicas comúnmente se realiza comparando entre dos condiciones distintas [248]. Sin embargo, en nuestro caso, con cuatro tipos de muestras interrelacionadas entre sí (desarrollo y regeneración de hueso), decidimos utilizar la clusterización de nuestros datos [177], [249]. Esta herramienta no solo nos permitió reconocer genes expresados diferencialmente en cada una de las condiciones, sino que también nos dio la chance de distinguir aquellos transcritos y RLN que eran compartidos entre dos o más muestras, proporcionando una aproximación más ajustada y precisa de los resultados obtenidos por secuenciación. Además, gracias a este procedimiento fuimos capaces de integrar ambas modalidades experimentales por medio del cruce de los clústeres análogos correspondientes a RNA-seq y ATAC-seq. La importancia de esta integración radica en que el perfil conjunto de la expresión génica y la accesibilidad a la cromatina de exactamente las mismas células ofrece un vínculo más directo entre los elementos reguladores en *-cis* y sus genes diana [250]. Es importante destacar que, aunque existen trabajos que correlacionan la expresión de genes diferenciales con cromatina abierta entre dos condiciones [70], [251], [252], [253], a la fecha, no existe un estudio que integre clústeres análogos complejos de RNA-seq y ATAC-seq, considerando tanto la apertura de la cromatina en el SIT como en elementos regulatorios distales. Sin duda, el cruce realizado en este trabajo es un aporte novedoso y pionero a la disciplina (Figura 29).

Es importante tener en cuenta que el volumen de genes candidatos obtenidos por cada una de las técnicas de secuenciación masiva es elevado, lo que dificulta la selección de los más importantes y su relación con aspectos fisiológicos o regulatorios [254]. Por otra parte, el solo concentrarse en un tipo de modalidad puede generar falsos positivos, ya que está supeditado a sesgos experimentales y al flujo de trabajo bioinformático utilizado. Por ello, la integración de técnicas como ATAC-seq y RNA-seq es crucial para un estudio detallado de la regulación transcripcional. En este trabajo, este procedimiento nos permitió validar y filtrar genes relevantes para el desarrollo y la regeneración de hueso en *Xenopus tropicalis*.

4.9. Variación entre la lógica regulatoria del desarrollo y la regeneración ósea

La comparación del enriquecimiento de los sitios de unión a factores de transcripción entre los elementos de cada clúster ATAC-seq reveló algunas diferencias importantes. En primer lugar, queda de manifiesto que la regeneración temprana, al poseer un microambiente inmune, es la única muestra que presenta elementos enriquecidos en sitios para Spi1 [186], [219] (Figura 27). Por otra parte, los sitios asociados a los factores de células osteogénicas, AP-1 y Dlx, presentan una dinámica

de enriquecimiento interesante. AP-1 es un dímero que se puede formar de dos maneras: primero, por la unión de un miembro de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD) con un miembro de la familia Fos (c-Fos, FosB, FosL1 y FosL2), y segundo, por la unión de dos miembros de la familia Jun. Los sitios de unión para AP-1 se encuentran principalmente enriquecidos en los clústeres de tejido no mineralizado y en las regiones esqueléticas ubicuas (Clúster VII) (Figura 27). Este resultado contrasta con los niveles de expresión que tienen los transcritos de AP-1, principalmente los de la familia Fos, los cuales se sobreexpresan exclusivamente en los osteoblastos (Figura 27, Mapas de calor). Nos encontramos con un grupo de RLN enriquecidos en sitios AP-1 que están abiertas en todas las etapas de la diferenciación osteoblástica; sin embargo, los elementos específicos de mesénquima y regeneración temprana podrían ser ocupados por el homodímero Jun/Jun. Al respecto, se ha determinado que, en células estromales osteoblásticas, c-Jun, regula a la alza la expresión de *mmp13* [255], gen que en nuestra data está a la alza específicamente en el tejido en regeneración no mineralizado (Figura 27D). En el caso de los osteoblastos, los elementos en los que se une AP-1 son menos, pero considerando la alta expresión de los miembros de la familia Fos (Figura 27, Mapas de calor), sugerimos que, en este tipo celular, AP-1 participa como heterodímero Jun/Fos. En mamíferos, la delección de *fosl1* o *fosl2* provoca anomalías en el esqueleto [216], [256], dejando en claro su importancia en el proceso de mineralización. Es llamativo que el tejido en regeneración 15dpi, a pesar de estar mineralizado, no recupera la expresión de los miembros de la familia Fos. Probablemente esto ocurre porque *fosl1*, *fosl2*, *fosb* y *c-fos* presentan una alza de expresión en osteoblastos que ya están maduros. De hecho, se había observado previamente en ratas que la expresión de los miembros AP-1 varía dependiendo del grado de desarrollo que tienen los osteoblastos en cultivo [257], [258].

El enriquecimiento de sitios de unión para Dlx aparece específicamente en los clústeres relacionados con la regeneración tardía (Figura 27). Si nos enfocamos en *dlx5*, observamos que este gen presenta una alta expresión a lo largo de todo el linaje osteoblástico, incluso presenta un elemento regulador cercano (Figura 29A). La presencia de *dlx5* en el linaje osteoblástico no solo fue corroborado por RNA-seq, sino que también por análisis de hibridación *in situ*, en los cuales se observa que este gen se expresa de manera constante en células mesenquimales, osteoblastos y osteocitos, tanto en hueso en desarrollo como en regeneración (Figura 29H). El alto grado de identidad en la secuencia del promotor de *dlx5* de rana y de humano denota una lógica regulatoria altamente conservada para la formación de hueso [244]; sin embargo, al mismo tiempo observamos que la dinámica de expresión de *dlx5* varía respecto al de los mamíferos, ya que, en esta clase de vertebrados, el nivel de *dlx5* alcanza su cenit en osteoblastos recién diferenciados y va disminuyendo a medida que los osteoblastos van madurando [259]. Ahora bien, esta situación se puede vincular con nuestros resultados si consideramos que los elementos reguladores de los osteoblastos de la regeneración temprana, es decir, osteoblastos recientemente diferenciados, requieren del factor Dlx5 para completar su programa genético de mineralización y maduración (Figura 27). A medida que pasa el

tiempo, estos elementos se cierran, y regiones en las que no se une Dlx5 se abren para controlar el programa genético de los osteoblastos maduros (Figura 27).

Por otra parte, es interesante mencionar que mientras las regiones de cromatina abierta específicas de la mesénquima y de los osteoblastos en desarrollo presentan un alto grado de identidad con las secuencias humanas, los elementos de regeneración temprana no presentan conservación (Figura 28). Esto puede deberse tanto al enriquecimiento de células inmunes [235], como a la presencia de regiones involucradas en la remodelación y la regeneración del hueso propias de los anfibios [244]. Además, se observa que las RLN de clústeres relacionados con la regeneración tardía recuperan el porcentaje de conservación (Figura 28), probablemente porque a esta altura se reactiva el programa transcripcional del desarrollo.

4.10. Elementos reguladores en *-cis* de la regeneración y el desarrollo de hueso

Al integrar los datos de ATAC-seq y RNA-seq, observamos que los genes con al menos una RLN en su clúster análogo presentan una mayor expresión y un promotor más abierto (Figura 29). Este patrón es consistente en la mayoría de los clústeres, excepto en los Clústeres 1 y 4, correspondientes a mesénquima osteogénica y regeneración tardía, respectivamente (Figura 29B, E). Esta excepción puede deberse a la complejidad técnica en la obtención de células mesenquimáticas, ya que se requieren al menos 40 individuos en el estadio NF52. Se ha demostrado que no hay una correlación perfecta entre estadio de desarrollo y estado de mineralización, y es posible que alguna mesénquima extraída haya tenido un mayor grado de mineralización [260], lo que puede haber sesgado los resultados. En el caso de la regeneración a 15dpi, las muestras de RNA-seq estaban enriquecidas con células que rodean el hueso nuevo, mientras que las de ATAC-seq estaban enriquecidas en osteoblastos de la zona mineralizada.

Además, la integración de ambas técnicas de secuenciación permitió identificar regiones de cromatina abierta específicas que se encuentran cercanas a genes con una expresión diferencial en un tipo de muestra determinada. Esto sugiere que estas regiones podrían actuar como enhancers putativos. En el caso de la mesénquima osteogénica (Figura 29B y 28A), es interesante mencionar que, mientras que *irx3* tiene un gran número de enhancers descritos [261], no se han reportado elementos reguladores para la transcripción de *nog*, un importante regulador de la osteogénesis en ratón [262]. Además, en cuanto a la función de *rflna* en el hueso, solo se sabe que mutaciones en su secuencia causan sinostosis espondilocarpotarsal en humanos [212], lo que sugiere la necesidad de profundizar en la función de este gen.

Los enhancers putativos asociados al desarrollo tardío de la calvaria son de particular interés debido a su especificidad para los osteoblastos del desarrollo y no de la regeneración (Figura 29C y 28B). Se ha informado que genes como *lep*, *fosl1* y *tgif1* están involucrados en el metabolismo y la homeostasis ósea [214], [215], [216], y probablemente se activan una vez que los osteoblastos

maduran. Por lo tanto, los enhancers putativos identificados pueden desempeñar un papel clave en este proceso.

Los elementos reconocidos en la regeneración temprana se clasifican como enhancers de regeneración tisular (Figura 29D y 30C). Dado que en esta muestra hay muchas células del sistema inmune que pueden interferir en la identificación de enhancers específicos de la regeneración ósea, utilizamos el paisaje regulatorio del hígado debido a su función en la mielopoiesis para realizar un análisis comparativo. De esta manera, seleccionamos solo los elementos abiertos en la regeneración temprana y cerrados en el hígado. Entre estos, destaca un enhancer putativo cercano al promotor de *mmp13*, un gen involucrado en la remodelación ósea y que se expresa en distintas etapas de la reparación de fracturas en ratón [263]; un enhancer putativo de *atp6v0d2*, un componente de una bomba de protones que ayuda a los osteoclastos a acidificar el medio para permitir la reabsorción del hueso [217]; y un enhancer putativo de *spi1* [219]. Este último es relevante porque en el hígado hay 12 regiones abiertas cercanas a este gen, algunas específicas de este tejido y otras compartidas, pero el enhancer putativo mencionado se activa exclusivamente en el microambiente inmune de la regeneración ósea (Anexo 8).

Los enhancers putativos asociados a la regeneración tardía están vinculados a genes de mineralización como *dmp1*, *runx2* y *phex* [109], [116], [221], y proponemos que esto se debe a la presencia de osteocitos en REG-15 (Figuras 29E, G y 30D, F). Por otro lado, el enhancer putativo más notable relacionado tanto con la regeneración temprana como con la mesénquima osteogénica (Clúster V) se localiza 3 kb río arriba de *sox2*, y podría estar potenciando su transcripción solo en el tejido no mineralizado (Figura 32A). Esto es interesante considerando que hay una región 160 kb río abajo de *sox2* que está abierta únicamente en osteoblastos y presenta un enriquecimiento de la marca represiva H3K27me3, lo que sugiere que podría estar funcionando como un silenciador de *sox2*. Estudios han demostrado que *sox2* posee una regulación transcripcional compleja con enhancers proximales y varios grupos de enhancers distales que actúan a largas distancias [264]. Por ejemplo, en el pollo se han identificado enhancers localizados a 200 kb que controlan la expresión de *sox2* durante el desarrollo del sistema nervioso central [265]. Un punto interesante del silenciador putativo identificado es que su secuencia está conservada en humanos, pero presenta una mutación en el sitio de unión del represor REST (Figura 32C). Sugerimos que esta variación impide que en osteoblastos humanos esta región actúe como un silenciador, lo que resulta en su estado cerrado (Figura 32B). En consecuencia, en mamíferos se pierde este mecanismo tipo *switch* enhancer-silenciador que posee la rana para encender y apagar la expresión de *sox2* (Figura 32A).

4.11. Identidad de las células precursoras residentes en el tejido en regeneración temprana

Los diagramas de PCA indican que tanto el perfil transcriptómico global como el paisaje regulatorio de la cromatina abierta durante la regeneración ósea temprana son más similares a los osteoblastos y a la regeneración ósea tardía que a la mesénquima osteogénica (Figuras 24 y 25). Este hallazgo

es especialmente interesante considerando que la regeneración ósea temprana aún no ha iniciado su proceso de mineralización, por lo que, en principio, se esperaría que tuviese una identidad más cercana a la mesénquima. Más detalladamente, la distinción molecular más notable entre las células precursoras que residen en el tejido que cubre la herida y los osteoprogenitores del desarrollo, es que estos últimos expresan un gran número de genes que controlan el patrón del eje anteroposterior, como *nog*, *irx3* y algunos miembros de la familia *hox* [266], [267], [268] (Figura 29B). En cambio, las células de la regeneración temprana mantienen una baja expresión de transcritos relacionados con el patrón del desarrollo óseo embrionario. Por otra parte, la carencia de mineral alrededor de los precursores de la regeneración temprana las aleja de la identidad de los osteoblastos. En este contexto, es interesante evaluar *mmp13*. La proteína codificada por este gen puede ser secretado tanto por precursores osteogénicos como por las denominadas células de reversión temprana [269], [270], [271]. Estas células, que pertenecen al linaje osteoblástico, se caracterizan por participar en la resorción del hueso viejo y la formación de hueso nuevo durante la regeneración ósea [272]. La información disponible sobre este tipo celular es bastante limitada, y el único marcador molecular asociado a estas células es *mmp13*.

Otro gen relevante en nuestro estudio es el que codifica para el factor de transcripción Sox2, el cual parece cumplir un rol clave para mantener indiferenciadas las células osteogénicas durante el desarrollo y la regeneración 5dpl. Sox2, junto a Oct4, Klf4 y c-Myc, pertenece a los factores Yamanaka, los cuales pueden convertir fibroblastos en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) [273]. Al respecto, Sox2 promueve la dediferenciación de células cancerosas en distintos tipos de cáncer [274], [275]. Además, se ha reportado que Sox2 es necesario en las primeras etapas de la dediferenciación neuronal requerida para el proceso regenerativo del epitelio olfativo tras inducirle una lesión [276].

Al tratar de entender la identidad de este tipo celular de la regeneración ósea, es importante tener en consideración que incluso los osteoblastos diferenciados presentan una heterogeneidad molecular y fisiológica dependiendo si son de huesos largos o planos [277]. Esto demuestra que la regulación génica de un tipo celular específico posee una complejidad y plasticidad que está determinada por el contexto.

En resumen, considerando que la dediferenciación parece ser un proceso clave en la regeneración efectiva y eficiente de los tejidos y que la identidad transcriptómica y de cromatina abierta de las células que conforman el tejido regenerativo no mineralizado es más similar a los osteoblastos que a la mesénquima, sugerimos que, tras la lesión, los osteoblastos dediferencian alcanzando un estado celular intermedio que le permite movilizarse, reactivar algunos elementos del programa genético utilizado en el desarrollo, proliferar, rellenar la herida y luego rediferenciarse en osteoblastos (Figura 33).

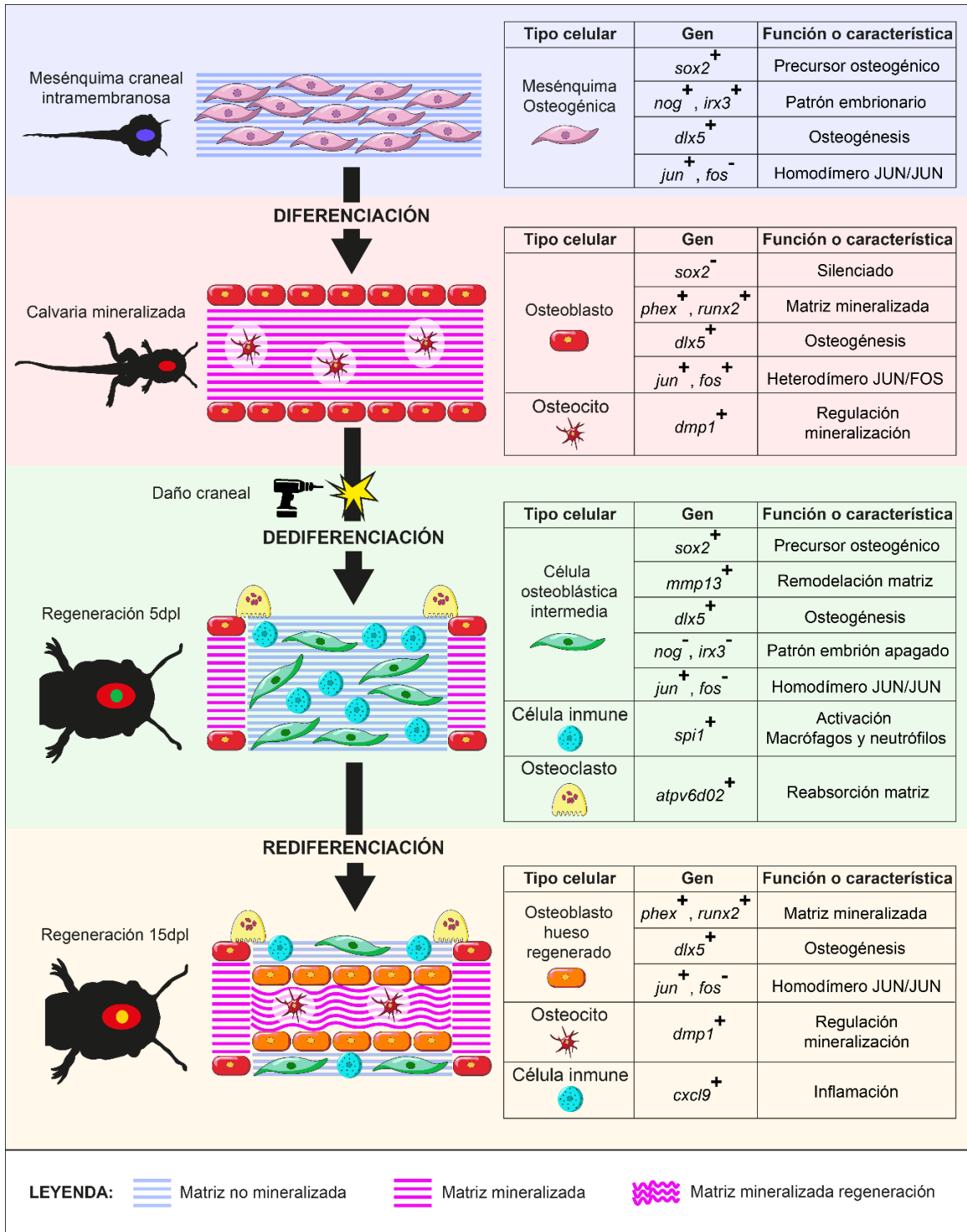


Figura 33. Modelo celular y molecular propuesto para el desarrollo y regeneración ósea intramembranosa en *Xenopus tropicalis*.

5. CONCLUSIONES

Mediante una nueva metodología basada en la clusterización e integración de datos ATAC-seq y RNA-seq, hemos descrito la dinámica de la accesibilidad de la cromatina y la expresión génica durante el desarrollo y la regeneración temprana y tardía del hueso intramembranoso en la rana *Xenopus tropicalis*. Proporcionamos una gran cantidad de evidencia basada en transcriptómica, ChiP-Seq, ontología génica y análisis de secuencias, que respalda fuertemente que nuestra estrategia identificó exitosamente promotores y enhancers específicos de los tejidos estudiados. Parte de la importancia que tiene haber generado estos resultados, es que es la primera vez que se describe el paisaje regulatorio del linaje osteoblástico en organismos no mamíferos. Sobre esto, destacamos que los elementos en *cis*- demuestran una lógica regulatoria conservada. A nivel del desarrollo óseo, estos datos son relevantes para la biología humana, ya que estudios GWAS han demostrado que los SNPs presentes en 35 de las regiones conservadas identificadas en osteoblastos causan fenotipos esqueléticos humanos.

Basados en los análisis de estos dos grandes conjuntos de datos sugerimos que las células del tejido regenerativo temprano reactivan algunos elementos del desarrollo óseo generando una identidad intermedia del linaje osteoblástico derivada de osteoblastos dediferenciados. En este proceso, *sox2* sería clave, ya que podría estar impulsando la dediferenciación de los osteoblastos para que recubran el lugar y proliferen. Posteriormente, estas células rediferenciarían en osteoblastos en un proceso guiado por *dlx5*.

Este estudio proporciona nuevos datos para entender los mecanismos moleculares que permiten al hueso de los anfibios formarse durante el desarrollo y regenerarse de manera eficiente tras un daño de tamaño crítico.

6. PERSPECTIVAS

6.1. Validación de elementos reguladores en *-cis* del desarrollo esquelético

Para validar los enhancers putativos de osteoblastos, es necesario realizar ensayos de reporteros en cultivo de osteoblastos primarios de *Xenopus tropicalis* [160]. Esto puede lograrse construyendo un plásmido que contenga la secuencia del enhancer putativo unido a un promotor basal que controle la expresión de GFP, además de un promotor ubicuo que dirija la expresión de mCherry como control de transfección. La intensidad de la fluorescencia puede cuantificarse mediante citometría de flujo para verificar la potenciación de la transcripción.

Adicionalmente, se puede abordar la lista de regiones conservadas con humanos que presentan una variante identificada por GWAS (Anexo 6) para realizar mutaciones dirigidas en estas secuencias en embriones de *Xt* mediante CRISPR-Cas9. Se espera obtener fenotipos con elementos esqueléticos anormales, por lo que, sería posible estudiar patologías específicas utilizando este modelo animal.

6.2. Identidad de las células del tejido en regeneración temprana

Primeramente, es posible realizar hibridación *in situ* fluorescente en cortes o en calvaria completa que se encuentra en proceso de regeneración, haciendo uso de sondas para genes relevantes en este estudio como *mmp13*, *spi1*, *atp6v0s2*, *sox2* y los miembros AP-1, para identificar cuáles son las células que expresan estos transcritos.

Por otra parte, podemos generar una visión aproximada de las poblaciones celulares que residen en la zona de regeneración temprana y tardía por medio de la deconvolución de datos de secuenciación de ARN, el cual es un método computacional utilizado para estimar las proporciones relativas de diferentes tipos de células o subpoblaciones dentro de una muestra heterogénea, basándose en la comparación de los perfiles de expresión génica con datos de RNA-seq de célula única [278]. Para esto proponemos utilizar el programa *Bulk2Space* [279] y cargar nuestros datos de RNA-seq de regeneración 5dpl y 15dpl, utilizando como referencia los resultados de RNA-seq de célula única obtenidos desde la regeneración de cola de *Xt* cargados en la base de datos del NCBI [280]. Esta estrategia nos permitiría reconocer la identidad de las células involucradas en la regeneración y generar una predicción espacial de estas poblaciones.

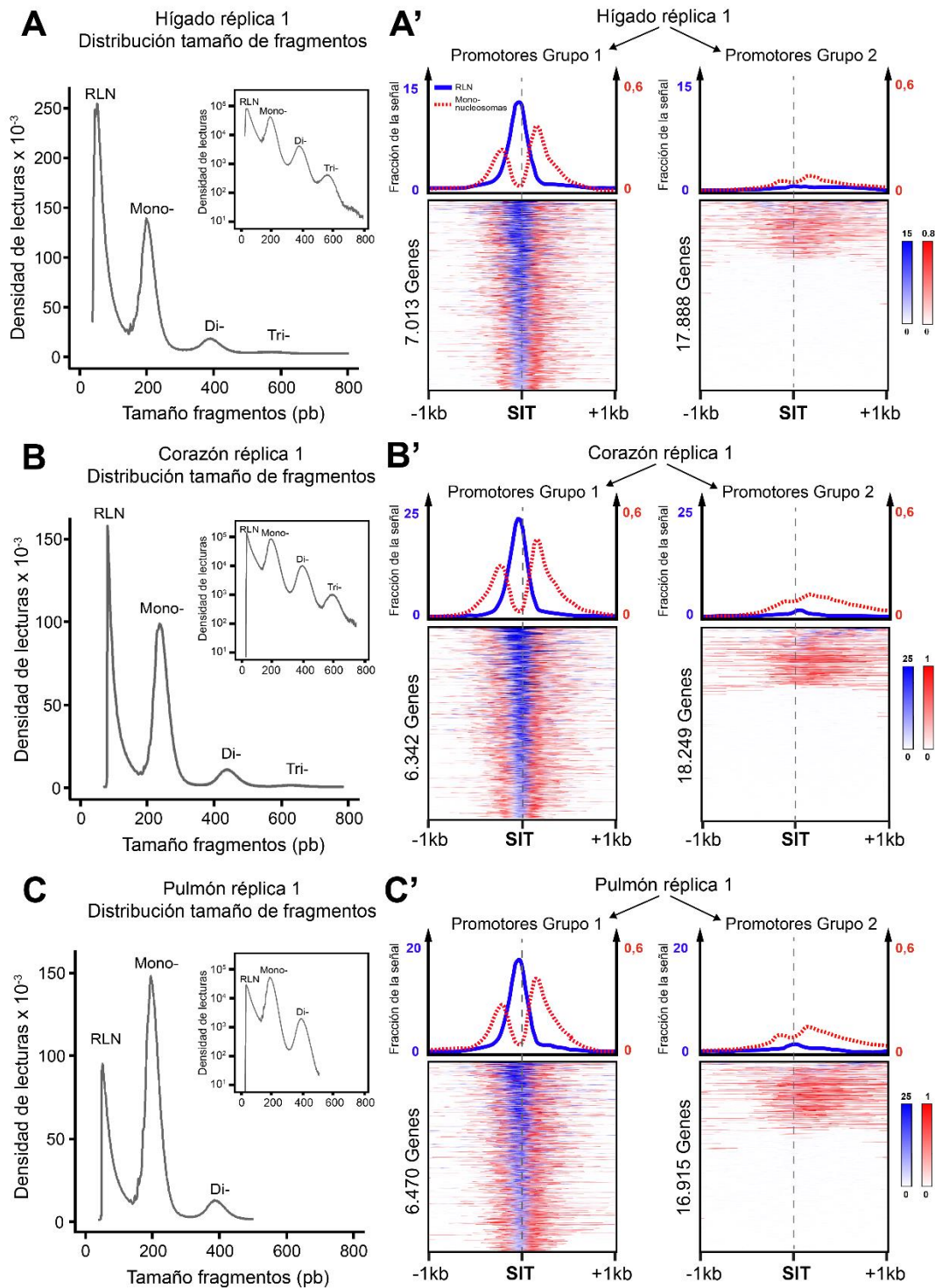
6.3. Comprobar la dediferenciación de osteoblastos

Para comprobar si efectivamente son los osteoblastos que rodean la herida los que se dediferencian para contribuir a la regeneración de la herida, es necesario hacer ensayos de trazado de linaje. Para esto se debe generar una línea de *Xt* transgénicas condicionales con la tecnología Cre-loxP [148], con una fluorescencia controlada por *fos/2* que permita marcar específicamente osteoblastos maduros. Así, luego de provocar la herida en la calvaria, se debe activar el transgén y realizar un rastreo del destino que tienen los osteoblastos durante el proceso de regeneración.

6.4. Evaluar los enhancers putativos de la regeneración ósea

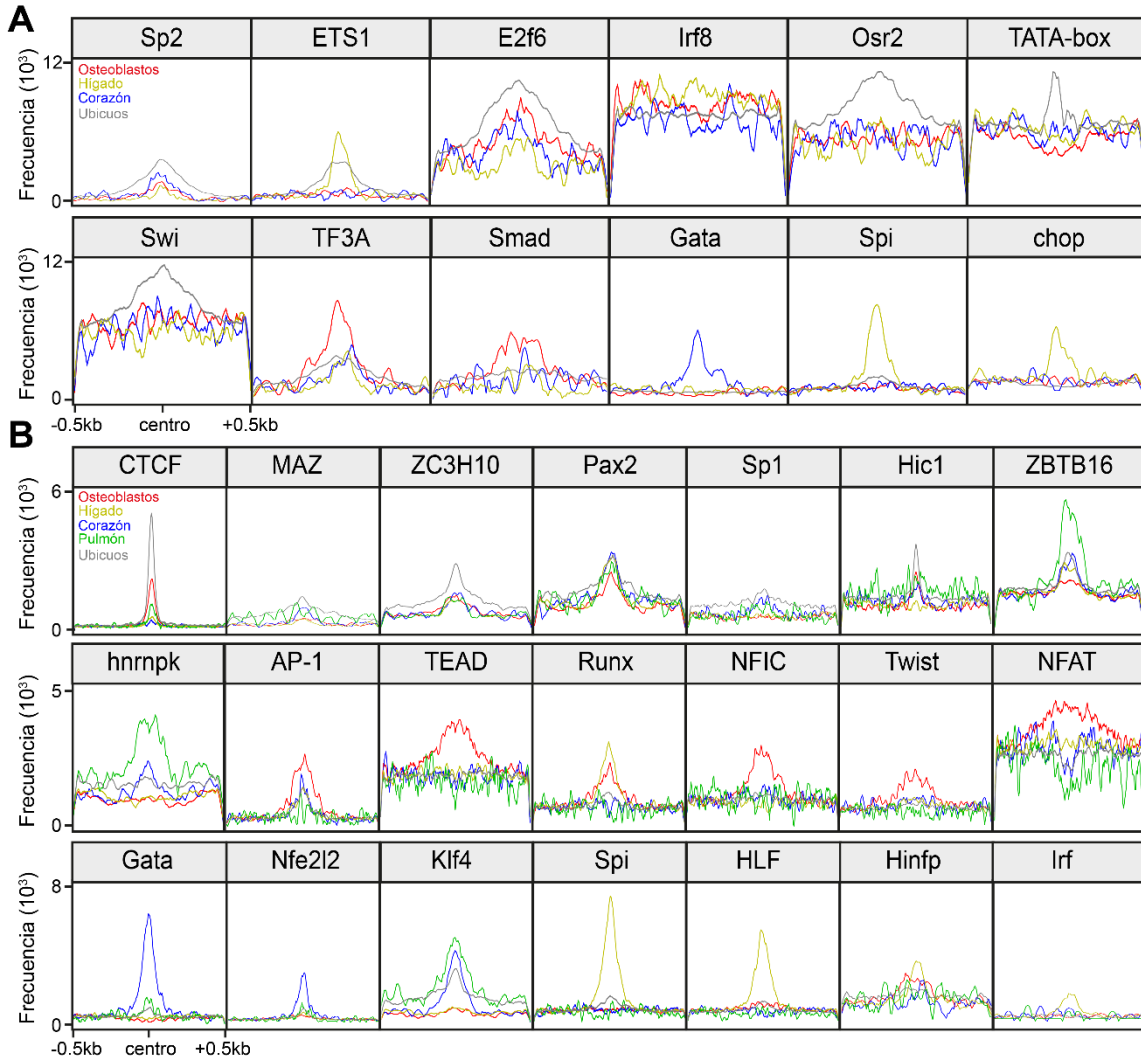
Para validar los enhancers específicos de la regeneración proponemos construir vectores de transgénesis HSP:enhancer-PromotorBasal-BFP, donde el promotor de HSP (Heat shock protein) permitirá la inducción por choque térmico del transgén, permitiendo identificar por microscopía si es que el enhancer potencia la transcripción de la proteína fluorescente específicamente en la zona de regeneración.

7. ANEXOS



Anexo 1. Distribución del tamaño de fragmentos en escalas lineal y logarítmica (en el recuadro) para la primera réplica de las muestras de hígado (A), corazón (B) y pulmón (C). (A'-C') Para cada tejido, las señales de RLN (azul) y mononucleosomas (rojo) en los SIT anotados de Xt se visualizan y se

separan en el grupo 1 (izquierda, promotores claramente abiertos que albergan señales altas tanto de RLN como de mononucleosomas) y el grupo 2 (derecha, promotores cerrados que carecen de una señal robusta de RLN y exhiben una señal de mononucleosomas difusa o ausente).



Anexo 2. Frecuencia de sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) en ventanas de 1 kb centradas en los picos de ATAC-Seq ubicados en los SIT (A) y en los no-SIT (B). Un código de colores indica los picos tejido-específicos (osteoblastos, rojo; hígado, marrón; corazón, azul; pulmón, verde) o ubicuos (gris).

<i>Xenopus tropicalis</i>					<i>Homo sapiens</i>					Pico ATAC-seq en Hs	Número RLN	Ubicación RLN
Cromosoma	Inicio	Término	Nombre del gen	Distancia al SIT	Cromosoma	Inicio	Término	Nombre del gen (Distancia al SIT)	Identidad			
Chr03	31792114	31792613	LOC101733648	1149	chr5	148785987	148786486	IL17B (27398), CSNK1A1 (144290)	78.977	Sí	1	Distal
Chr04	29014481	29014980	LOC100485614	296	chr1	86044065	86044564	CYR61 (2129)	83.972	Sí	2	Distal
Chr04	44192856	44193355	fto	29766	chr16	53698835	53699334	AKTIP (161922), FTO (38673)	83.077	Sí	3	Distal
Chr01	181507844	181508343	mmps30	80287	chr5	44546305	44546804	MRPS30 (262472), FGF10 (157656)	79.077	Sí	4	Distal
Chr06	70708550	70709049	ulk4	117606	chr3	41722948	41723447	ULK4 (280724), CTNNB1 (482268)	72.065	Sí	5	Distal
Chr03	42920673	42921172	ptprq	72140	chr12	80973991	80974490	MYF6 (127036), PTPRQ (136115)	76.503	Sí	6	Distal
Chr05	71909255	71909754	Xetrov90014027m.g	56215	chr6	116511652	116512151	COL10A1 (64839), TSPYL4 (63359)	74.497	Sí	7	Distal
Chr06	112036348	112036847	runx11f	6434	chr8	93071802	93072301	RUNX1T1 (35654), SLC26A7 (810517)	80.48	Sí	8	Distal
Chr01	175272194	175272693	Xetrov90003518m.g	43903	chr5	64423321	64423820	ADAMTS6 (354176), CWC27 (358814)	68.889	Sí	9	Distal
Chr04	79496477	79496976	pde4b	8441	chr1	66648126	66648625	SGIP1 (351589), PDE4B (390179)	84.36	Sí	10	Distal
Chr01	119009778	119010277	rorb	56987	chr9	77169903	77170402	RORB (57872), TRPM6 (332857)	77.005	Sí	11	Distal

scaffold_323	171507	172006	sox5	108331	chr12	23836974	23837473	SOX5 (265413)	80.838	Sl	12	Distal
Chr01	134620223	134620722	mcc	42040	chr5	112458201	112458700	DCP2 (146018), MCC (312277)	77.632	Sl	13	Distal
Chr02	95605361	95605860	auts2	318880	chr7	69557151	69557650	AUTS2 (493082)	85.498	Sl	14	Distal
Chr01	162476494	162476993	LOC10645694	141701	chr5	116536592	116537091	SEMA6A (626212)	76.389	Sl	15	Distal
Chr08	46817741	46818240	gpc4	8989	chrX	132546225	132546724	TFDP3 (194099), GPC4 (3043)	87.665	Sl	16	Distal
Chr07	13997539	13998038	ebf3	12059	chr10	131751962	131752461	EBF3 (9869), MGMT (486788)	87.113	Sl	17	Distal
Chr08	36005174	36005673	af2-like.1	26459	chrX	147741050	147741549	AFF2 (159161), IDS (845577)	77.419	Sl	18	Distal
Chr09	48055804	48056303	nrx2	187229	chr2	206375961	206376460	NRX2 (171013), PARD3B (965488)	68.208	Sl	19	Distal
Chr07	77024195	77024694	fbxl4	7077	chr1	12600182	12600681	FBXL4 (77305), VPS13D (310308)	70.988	Sl	20	Distal
Chr06	45706779	45707278	etv1	33735	chr7	13959681	13960180	ETV1 (69640)	70.937	Sl	21	Distal
Chr02	25236673	25237172	Xetv90004241m.g	1091	chr17	27904475	27904974	TP53I13 (9063), GIT1 (11842)	79.048	Sl	22	Distal
scaffold_69	605139	605638	smim20	49604	chr4	26207981	26208480	RBPJ (113101), SMIM20 (292405)	76.652	Sl	23	Distal
Chr01	160296967	160297466	znf608	10372	chr5	124071761	124072260	ZNF608 (9107)	83.26	Sl	24	Distal
Chr01	9169609	9170108	dysf-like	75923	chr2	71791021	71791520	DYSF (97439), CYP26B1 (583896)	76.471	Sl	25	Distal
Chr06	42279744	42280243	rapgef5	30036	chr7	22193903	22194402	CDC47L (208451), RAPGEF5 (202380)	72.903	Sl	26	Distal
Chr06	120841237	120841736	trps1	63150	chr8	11647670	116477169	TRPS1 (204308)	82.105	Sl	27	Distal
Chr03	53018000	53018499	pawr	24440	chr12	80042530	80043029	PAWR (42097), SYT1 (784331)	73.723	Sl	28	Distal
Chr03	48042193	48042692	Xetv90007980m.g	8136	chr12	66285750	66286249	HMG2A (68089), LLPH (238548)	73.333	Sl	29	Distal
Chr08	74418517	74419016	sam4a	53571	chr14	55118833	55119332	SAMD4A (84448), GCH1 (250487)	81.148	Sl	30	Distal
Chr07	50575511	50576010	ccsr2	11887	chr10	86184439	86184938	CCSR2 (96270)	71.831	Sl	31	Distal
Chr06	28465754	28466253	Xetv90015838m.g	23337	chr18	77348861	77349360	CTDPI (90690), NFATC1 (188775)	79.33	Sl	32	Distal
Chr01	56099099	56099598	Xetv90001028m.g	17574	chr4	124753840	124754339	SPRY1 (433425), ANKRD50 (879797)	77.419	Sl	33	Distal
Chr06	121482886	121483385	elf3	73718	chr8	117670577	117671076	TRPS1 (989599), EIF3H (97233)	85.911	Sl	34	Distal
Chr01	115373924	115374423	rxr3	114571	chr9	3862995	3863494	RXR3 (337262), GLIS3 (436671)	69.444	Sl	35	Distal
Chr03	52448141	52448640	nav3	66217	chr12	78333809	78334308	SYT1 (924390), NAV3 (108990)	71.845	Sl	36	Distal
Chr06	45679193	45679692	etv1	6149	chr7	14020670	14021169	ETV1 (8651)	85.401	Sl	37	Distal
Chr04	108081681	108082180	Xetv90012331m.g	44150	chr1	170278404	170278903	GORAB (222616), METTL1B (163512)	80.087	Sl	38	Distal
Chr04	59357990	59358489	cdh11	5864	chr16	65151735	65152234	CDH11 (4116)	77.228	Sl	39	Distal
Chr06	112019329	112019828	runx1f1	23453	chr8	93031315	93031814	RUNX1T1 (76141), SLC26A7 (770030)	81.818	Sl	40	Distal
Chr06	30997397	30997896	prl.1	41950	chr6	22145960	22146459	PRL (151520), SOX4 (552238)	71.324	Sl	41	Distal
Chr01	122861013	122861512	gas1	77363	chr9	89409185	89409684	ZCCHC6 (440108), GAS1 (152669)	76.923	Sl	42	Distal
Chr06	105529581	105530080	xkr9	12287	chr8	71751933	71752432	XKR9 (170583), EYA1 (522284)	73.451	Sl	43	Distal
Chr01	164133387	164133886	hlf2	1755	chr5	77883156	77883655	LHFPL2 (61242), SCAMP1 (227067)	75.735	Sl	44	Distal
Chr02	8845805	8846304	bca3	195786	chr17	59234854	59235353	TBX2 (242153), BCAS3 (479854)	93.173	Sl	45	Distal
Chr03	104844467	104844966	Xetv90008978m.g	34712	chr15	99421244	99421743	PGPEP1L (127297), IGF1R (229294)	70.968	Sl	46	Distal
Chr05	2275962	2275962	jpg1	66068	chr20	10600055	10600554	JAG1 (54389), SLX4IP (184354)	78.481	Sl	47	Distal
Chr05	96047860	96048359	sox2	159310	chr3	18182673	18183172	ATP1B (688365), SOX2 (393201)	86.23	Sl	48	Distal
Chr06	93135234	93135733	colec12	35663	chr18	424220	424219	THOC1 (156443), COLEC12 (76252)	78.261	Sl	49	Distal
Chr06	107440446	107404945	zfx4	110223	chr8	77493550	77494049	ZFX4 (99654)	85.924	Sl	50	Distal
Chr01	105270691	105271190	LOC100493452	109259	chr9	15936323	15936732	PSIP1 (425466), BNC2 (934221)	84.581	Sl	51	Distal
Chr06	114524440	114524939	atoh1	74266	chr8	98305340	98305839	MTDH (350817), TSPYL5 (15414)	68.182	Sl	52	Distal
Chr06	48282062	48282561	mbx	4789	chr6	16432814	16433313	GMPR1 (194253), ATXN1 (328623)	72.034	Sl	53	Distal
scaffold_628	49493	49992	nellcd	12392	chr20	57482782	57483281	NELFCD (73231), GNAS (55263)	76.389	Sl	54	Distal
Chr09	67514259	67514758	rims1	21391	chr2	161522692	161523191	TANK (493866), RBMS1 (172637)	74.83	Sl	55	Distal
Chr06	18800594	18801093	mlr10	45907	chr10	22013578	22014077	MLL1T0 (190556), DNAJC1 (278826)	79.182	Sl	56	Distal
Chr03	48027874	48028373	Xetv900107980m.g	6183	chr12	66342345	66342844	HMG2A (124684), LLPH (181953)	78.006	Sl	57	Distal
Chr04	77565073	77565572	nfia-like.2	53287	chr1	61623105	61623604	NFIA (75821), TM2D1 (567740)	72.267	Sl	58	Distal
Chr05	143844552	143845051	cdk5l	44784	chr6	44457926	44458425	RUNX2 (837930), CDC5L (102914)	77.424	Sl	59	Distal
Chr06	23679783	23680282	cdk6	29674	chr7	92327418	92327917	FAM138B (107960), CDK6 (135563)	88.333	Sl	60	Distal
Chr01	141073529	141038028	mm1	404061	chr22	27816552	27817051	MM1 (380684), CRYBA4 (798874)	70	Sl	61	Distal
Chr05	11730064	11730563	Xetv90013111m.g	18346	chr1	210435852	210436351	HHAT (66148), SERTAD4 (29958)	75.884	Sl	62	Distal
Chr06	101405409	101405908	Xetv90016831m.g	2648	chr8	59058223	59058722	UBXN2B (265350), FAM110B (151360)	78.571	Sl	63	Distal
Chr01	105563398	105563897	bnc2	60227	chr9	16522029	16522528	BNC2 (348425)	88.636	Sl	64	Distal
Chr07	88006912	88007411	mir125b-1	1589	chr11	121972220	121972719	BLID (14453), SORL1 (649558)	75.591	Sl	65	Distal
Chr05	73347193	73347692	Xetv90014042m.g	60349	chr6	113227857	113228356	MARCKS (950434), RFL4B (559575)	68.231	Sl	66	Distal
Chr05	126565967	126566466	megs	27673	chr3	134049894	134050393	RYK (80650), AMOTL2 (43292)	74.726	Sl	67	Distal
Chr05	22766189	22766688	jpg1	55841	chr20	10603279	10603778	JAG1 (51165), SLX4IP (187578)	70.803	Sl	68	Distal
Chr01	116480197	116480696	dmt1	16947	chr9	893740	894239	DMRT3 (82974), DMRT1 (52300)	75.714	Sl	69	Distal
Chr06	102120191	102120690	LOC10647927	6988	chr8	61532353	61532852	CHD7 (58734), RAB2A (103187)	81.501	Sl	70	Distal
scaffold_602	64214	64713	7332	3331	chr3	11623005	11624005	VGLL4 (61642), ATG7 (309654)	69.591	Sl	71	Distal
Chr03	102971142	102971641	mcp2	50984	chr15	94896299	94896798	MCP2 (55054)	80.278	Sl	72	Distal
Chr06	10869849	108663048	hey1	44290	chr8	80739598	80740097	HEY1 (59756), MRPS28 (202658)	74.153	Sl	73	Distal
Chr06	28382477	28382976	Xetv90015838m.g	59940	chr18	77245803	77246302	CTDPI (193748), NFATC1 (85717)	71.139	Sl	74	Distal
Chr03	48216532	48217031	lem3d	55796	chr12	65721040	65721539	HMG2A (496621), MSRB3 (48867)	87.089	Sl	75	Distal
Chr04	77608023	77608522	nfia-like.2	65323	chr1	61709716	61710215	NFIA (162432), TM2D1 (481129)	90.397	Sl	76	Distal
Chr01	66523385	66523884	unc5c	51870	chr4	96426251	96426750	UNC5C (43856), BMPR1B (453671)	76.25	Sl	77	Distal
Chr08	36670569	36671068	maml1	10648	chrX	14953206	149535705	MTM1 (201613), MAML1 (3770)	73.718	Sl	78	Distal
Chr05	26527971	26528470	fncl	15992	chr2	58358315	58358814	FANCL (109920), VRK2 (223779)	88.276	Sl	79	Distal
Chr01	125640971	125641470	shc3	1204	chr9	91793900	91793999	SHC3 (68)	73.964	Sl	80	Distal
Chr03	2962946	2963445	Xetv900107110m.g	186544	chr12	4140435	4140934	CCND2 (242253), PARP11 (158145)	82.304	Sl	81	Distal
Chr05	24453775	24454274	naa20	33798	chr20	19955338	19955837	NAA20 (42172), RIN2 (88423)	72.554	Sl	82	Distal
Chr05	130590883	130591382	Xetv90015155m.g	46160	chr2	12003930	12004429	TRIB2 (852835), LPIN1 (186459)	66.207	Sl	83	Distal
Chr01	121437507	121438006	MGC147600	180308	chr9	85103492	85103991	SPATA31D1 (500055), RASEF (574301)	92.898	Sl	84	Distal
Chr07	77486619	77487118	tdgf	29554	chr8	18744010	18744509	PSD3 (126936), NAT2 (495505)	79.781	Sl	85	Distal
Chr05	44395073	44395572	ctgf	2779	chr6	132275773	132276272	CTGF (3510)	75.966	Sl	86	Distal
Chr02	150013456	150013955	stard13	23730	chr13	33778672	33779171	STARD13 (80970), KL (188351)	73.393	Sl	87	Distal
Chr04	973											

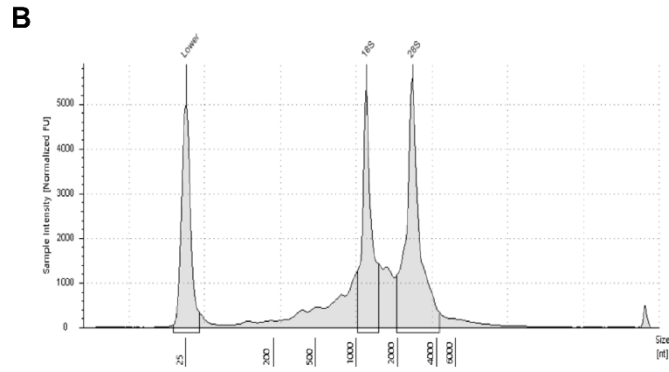
Chr09	66008072	66008571	<i>fign</i>	175912	chr2	164870604	164871103	FIGN (278337), GRB14 (607504)	88.183	Sl	120	Distal
Chr05	83389646	83390145	<i>bach2</i>	7201	chr6	90928144	90928643	BACH2 (78067), GJA10 (324206)	89.726	Sl	121	Distal
Chr07	73559110	73559609	<i>zbtb16</i>	44025	chr11	114030673	114031172	NMNT (97630), ZBTB16 (100608)	75.455	Sl	122	Distal
Chr06	32077962	32078461	<i>creb5</i>	255	chr7	28725401	28725900	CHN2 (503877), CREB5 (273507)	73.554	Sl	123	Distal
Chr05	100117448	100117947	<i>Xetov90014444m.g</i>	250	chr3	188665712	188666211	TPRG1 (223801), LPP (735241)	80.252	Sl	124	Distal
Chr01	26159631	26160130	<i>LOC105945533</i>	3702	chr4	38668618	38669117	KLF3 (3051), TLR10 (115711)	80.712	Sl	125	Distal
Chr07	73557200	73557699	<i>zbtb16</i>	45935	chr11	114035009	114034008	NMNT (94794), ZBTB16 (103444)	79.184	Sl	126	Distal
Chr10	20429115	20429614	<i>LOC105947954</i>	530	chr17	79367641	79368140	TMEM105 (63417), ACTG1 (111916)	79.894	Sl	127	Distal
Chr05	37441111	37441610	<i>syne1</i>	6092	chr6	152622854	152623353	SYNE1 (335430), ESR1 (611473)	79.812	Sl	128	Distal
Chr08	93931045	93931544	<i>bmf</i>	13900	chr15	40361253	40361752	SRP14 (30114), BMF (39572)	69.73	Sl	129	Distal
Chr09	72702454	72702953	<i>Xetov90024446m.g</i>	142114	chr2	146509655	146510154	NONE	78.182	Sl	130	Distal
Chr08	19529142	19529641	<i>msn</i>	16121	chrX	64821407	64821906	LAS1L (67021), MSN (65880)	72.358	Sl	131	Distal
Chr03	72051524	72052023	<i>bend7</i>	71112	chr10	13749343	13749842	PRPF18 (120666), FRMD4A (623290)	75.912	Sl	132	Distal
Chr05	10015469	10015968	<i>prox1</i>	351	chr1	214161033	214161532	PROX1 (3)	75.598	Sl	133	Distal
Chr01	174213426	174213925	<i>cd180</i>	22242	chr5	66563976	66564475	PIK3R1 (947322), CD180 (71599)	77.165	Sl	134	Distal
Chr05	115449204	115449703	<i>LOC108647615</i>	956	chr2	227514755	227515254	IRS1 (149470)	74.915	Sl	135	Distal
Chr05	15308808	15309307	<i>six2</i>	8	chr2	45236443	45236942	SIX2 (124)	72.396	Sl	136	SIT
Chr03	10203073	10203572	<i>calc1</i>	35	chr7	134463932	134464431	CALD1 (219)	67.052	Sl	137	SIT
Chr05	143433687	143434186	<i>runx2</i>	221	chr6	45295680	45296179	RUNX2 (176)	83.102	Sl	138	SIT
Chr08	66182110	66182609	<i>tbln5</i>	126	chr14	92413619	92414118	FBLN5 (298)	87.113	Sl	139	SIT
Chr05	115944067	115944566	<i>dock10</i>	115	chr2	225846912	225847411	CUL3 (397097), DOCK10 (59997)	83.984	Sl	140	SIT
Chr02	18097448	18097947	<i>epha3</i>	8	chr3	89156586	89157085	EPHA3 (162)	82.418	Sl	141	SIT
Chr09	49431037	49431536	<i>ab2</i>	14	chr2	204193041	204193540	AB2 (288)	84.932	Sl	142	SIT
Chr07	16321615	16322114	<i>adam12</i>	168	chr10	128076780	128077279	ADAM12 (6)	68.456	Sl	143	SIT
Chr05	56774307	56774806	<i>ltbp1</i>	148	chr2	33359231	33359730	RASGRP3 (341814), LTBP1 (187442)	73.499	Sl	144	SIT
Chr04	97340893	97341392	<i>mir199a</i>	353	chr1	172113809	172114308	C1orf105 (275769), DNM3 (303438)	88.959	Sl	145	SIT
Chr06	95220943	95221442	<i>znf521</i>	48	chr18	22931805	22932304	ZNFS21 (61)	99.123	Sl	146	SIT
Chr01	31632014	31632513	<i>paics.1</i>	68	chr4	57276386	57276885	AASDH (22970), PPAT (25145)	76.364	Sl	147	SIT
scaffold_73	1026725	1027224	<i>dlx5</i>	110	chr7	96653502	96654001	DLX5 (657)	72.398	Sl	148	SIT
Chr01	16598368	16598867	<i>ldb2</i>	118	chr4	16899914	16900413	LDB2 (268)	75.522	Sl	149	SIT
Chr01	105636982	105637481	<i>bnc2</i>	30	chr9	16704840	16705339	BNC2 (165614)	74.603	Sl	150	SIT
Chr02	13306963	13307462	<i>tuba1b</i>	1	chr12	49582584	49583083	TUBA1A (273)	75.309	Sl	151	SIT
Chr03	103950530	103951029	<i>LOC105946774</i>	43	chr15	96873632	96874131	NR2F2 (64)	79.621	Sl	152	SIT
Chr05	44397831	44398330	<i>ctgf</i>	21	chr6	132272359	132272858	CTGF (96)	82.328	Sl	153	SIT
Chr01	52730023	52730522	<i>pcdh18</i>	33	chr4	138453421	138453920	PCDH18 (42)	81.437	Sl	154	SIT
Chr03	27993510	27994009	<i>spry4</i>	8	chr5	141704392	141704891	SPRY4 (76)	72.662	Sl	155	SIT
Chr08	81267361	81267860	<i>rhoj</i>	151	chr14	63670807	63671306	RHOJ (69)	82.667	Sl	156	SIT
Chr01	149189423	149189922	<i>adgr1</i>	28	chr12	131438166	131438665	GPR133 (36)	83.684	Sl	157	SIT
Chr09	49723317	49723816	<i>map3k13</i>	54	chr3	185080744	185081243	MAP3K13 (86)	75.49	Sl	158	SIT
Chr06	122929404	122929903	<i>enpp2</i>	64	chr8	120650904	120651403	ENPP2 (84)	77.311	Sl	159	SIT
Chr06	75463540	75464039	<i>rims3</i>	86	chr3	29322251	29322750	RIMS3 (336)	79.545	Sl	160	SIT
Chr08	90867311	90867810	<i>meis2</i>	99	chr15	37392373	37392872	MEIS2 (537)	75.714	Sl	161	SIT
Chr06	45672931	45673430	<i>etv1</i>	113	chr7	14029080	14029579	ETV1 (241)	73.529	Sl	162	SIT
Chr01	178117002	178117501	<i>map3k1</i>	37196	chr5	55973463	55973962	ILEST (682892), MAP3K1 (137688)	73.485	NO	Sin numero	Distal
Chr01	174456709	174457208	<i>mas4</i>	57767	chr5	66124300	66124799	MAST4 (232361), CD180 (368077)	77.619	NO	Sin numero	Distal
Chr01	170373231	170373730	<i>me2c</i>	10733	chr5	88129048	88129547	TMEM161B (564633), MEF2C (70601)	79.825	NO	Sin numero	Distal
Chr01	166798461	166798960	<i>lcho2</i>	890	chr5	72207230	72207729	FCHO2 (44328), TNPO1 (95341)	82.673	NO	Sin numero	Distal
Chr01	166759127	166759626	<i>lcho2</i>	24870	chr5	72286366	72286865	TMEM171 (129503), FCHO2 (34808)	72.84	NO	Sin numero	Distal
Chr01	141619482	141619981	<i>patrb.2</i>	90686	chr22	28501414	28501913	PITPNB (186408), TTC28 (574189)	87.869	NO	Sin numero	Distal
Chr01	135163376	135163875	<i>camk4</i>	4605	chr5	110813894	110814393	STAR4A (34064), CAMK4 (254360)	85.926	NO	Sin numero	Distal
Chr01	130092617	130093116	<i>nflca1</i>	2824	chr17	47242568	47243067	B4GALNT2 (32489), GNGT2 (43944)	74.158	NO	Sin numero	Distal
Chr01	123636700	123637199	<i>ptch1</i>	44483	chr9	98224570	98225069	FANCC (144836), PTCH1 (46123)	82.384	NO	Sin numero	Distal
Chr01	116192291	116192790	<i>dmr2</i>	111910	chr9	1319928	1320427	SMARCA2 (701767), DMR2 (269824)	92.308	NO	Sin numero	Distal
Chr01	112225211	112225710	<i>LOC105945258</i>	10220	chr9	14203283	14203782	MPDZ (923970), NFIB (110133)	85.437	NO	Sin numero	Distal
Chr01	107805010	107805509	<i>nipsnap3a</i>	20784	chr9	107560554	107561053	NIPSNAP3B (34353), ABCA1 (129714)	84.615	NO	Sin numero	Distal
Chr01	76661779	76662278	<i>cfor2</i>	12531	chr4	81283725	81284224	BMP3 (668144), FGF5 (96222)	75.54	NO	Sin numero	Distal
Chr01	66723545	66724044	<i>bmp1b</i>	51212	chr4	96049592	96046451	BMP1B (73372), UNC5C (424155)	81.818	NO	Sin numero	Distal
Chr01	57578882	57579381	<i>Xetov90010688m.g</i>	114	chr4	108972427	108972926	HADH (61807), LEF1 (116901)	76.471	NO	Sin numero	Distal
Chr01	56245305	56245804	<i>spata5</i>	25652	chr4	124205888	124205787	SPRY1 (115127), SPATA5 (361309)	80.734	NO	Sin numero	Distal
Chr01	49188237	49188736	<i>smad1</i>	7503	chr4	146466593	146467392	MMAA (72272), SMAD1 (63180)	77.178	NO	Sin numero	Distal
Chr01	33129035	33129534	<i>mtmr7</i>	13314	chr8	17188474	17188973	CNOT7 (84337), MTMR7 (82112)	87.234	NO	Sin numero	Distal
Chr01	31745318	31745817	<i>kiaa1456</i>	12084	chr8	12878330	12878829	KIAA1456 (75394), DLC1 (493815)	82.313	NO	Sin numero	Distal
Chr01	30454849	30455348	<i>scfd2</i>	5273	chr4	54179619	54180118	SCFD2 (52373), RASL11B (454112)	79.167	NO	Sin numero	Distal
Chr02	166347510	166348009	<i>fam181b</i>	4299	chr11	82468147	82468646	PRCP (143075)	76.289	NO	Sin numero	Distal
Chr02	163092635	163093134	<i>fai3</i>	127002	chr11	92600071	92600570	MTNR1B (102565), FAT3 (515059)	79.508	NO	Sin numero	Distal
Chr02	150307260	150307759	<i>Xetov90010665m.g</i>	21437	chr13	32783547	32784046	ZAR1L (105684), FRY (178360)	80.645	NO	Sin numero	Distal
Chr02	146185457	146185956	<i>hnc3a</i>	2037	chr13	49672284	49672783	MLNR (121940), FNDC3A (122486)	76.018	NO	Sin numero	Distal
Chr02	135911443	135911942	<i>cfor2</i>	20526	chr2	192205984	192206483	NABP1 (337024), MYO1B (96119)	84.167	NO	Sin numero	Distal
Chr02	72374208	72374707	<i>tbl1x</i>	10885	chrY	6938055	6938554	TBL1Y (159578)	81.379	NO	Sin numero	Distal
Chr02	42085696	42086195	<i>cxu1</i>	21919	chr7	101688308	101688807	SH2B2 (239847), CUX1 (223267)	87.815	NO	Sin numero	Distal
Chr02	27476360	27476859	<i>smg6</i>	62557	chr17	2082862	2083361	SRR (123886), HIC1 (123508)	80.286	NO	Sin numero	Distal
Chr02	27454131	27454630	<i>smg6</i>	40328	chr17	2118702	2119201	SRR (80406), HIC1 (159348)	74.235	NO	Sin numero	Distal
Chr03	128321365	128321864	<i>rg3</i>	555	chr4	141731819	141732318	TBC1D9 (54795), RNF150 (321927)	71.951	NO	Sin numero	Distal
Chr03	103325266	103325765	<i>mcp2</i>	405108	chr15	95839184	95839683	MCTP2 (997939)	96.212	NO	Sin numero	Distal
Chr03	93864970	93865469	<i>dut</i>	43978	chr15	48740778	48741277	DUT (117408), FBN1 (197018)	80.147	NO	Sin numero	Distal
Chr03	58438408	58438907	<i>caiv2</i>	44580	chr7	115994133	115994632	CAV2 (145061), TES (143836)	74.879	NO	Sin numero	Distal
Chr03	57689000	57689499	<i>foxp2</i>	16303	chr7	114072706	114073205	MDFIC (489253), FOXP2 (17904)	97.154	NO	Sin numero	Distal
Chr03	57629486	57629985	<i>LOC10594931</i>	29804	chr7	113985355	113985854	PPP1R3A (426485), FOXP2 (69447)	74.438	NO	Sin numero	Distal
Chr03	48196637	48197136	<i>Xetov900107961m.g</i>	60881	chr12	65824634	65825133	HMGAG (393027), MSRB3 (152461)	76.974	NO	Sin numero	Distal
Chr03	34884702	34885201	<i>tbx38</i>	90595	chr5	147889193	147894192	FBXO38 (125878), HTR4 (144273)	75.182	NO	Sin numero	Distal
Chr04	108221541	108222040	<i>scy3</i>	18518	chr1	169930059	169930558	SCYL3 (67233), KIFAP3 (113527)	84.173	NO	Sin numero	Distal
Chr04	95435277	95435776	<i>ircdb</i>	2247	chr1	90400632	90401131	ZNFS36 (59732), LRR8B (114291)	70.021	NO	Sin numero	Distal
Chr04	94742739	94743238	<i>cdc7</i>	25900	chr1	91992033	91992532	CDC7 (25618), TGFB3 (395904)	84.127	NO	Sin numero	Distal
Chr04	94592167	94592666	<i>tgfb3</i>	38964	chr1	92235183	92235682	TGFB3 (116354), CDC7 (

Chr06	98556597	98557096	<i>snai2</i>	118094	chr8	49494829	49495328	EFCAB1 (152712), UBE2V2 (574119)	93.082	NO	Sin número	Distal
Chr06	66247449	66247948	<i>gli3</i>	2169	chr7	42191083	42191382	INHBA (448427), GLI3 (85479)	79.193	NO	Sin número	Distal
Chr06	52250815	52251314	<i>Xetv90016160m.g</i>	9245	chr6	2679326	2679825	GMD5 (433650), MYLK4 (71624)	84.672	NO	Sin número	Distal
Chr06	31674016	31674515	<i>prr15</i>	39853	chr7	29519359	29519858	CPVL (284717), PRR15 (83818)	65.992	NO	Sin número	Distal
Chr06	26007080	26007579	<i>bbs9</i>	36572	chr7	33313246	33313745	BMPEP (631027), BBS9 (144352)	75.159	NO	Sin número	Distal
Chr06	16371980	16372479	<i>mxx</i>	37149	chr10	28127294	28127793	MXR (92255), ARMC4 (160433)	77.295	NO	Sin número	Distal
Chr06	13295543	13296042	<i>ccny</i>	671	chr10	35854781	35855280	GJD4 (93037), CCNY (229229)	83.429	NO	Sin número	Distal
Chr07	11262582	112626081	<i>LOC105947962</i>	21246	chr17	77876671	77877170	CBX4 (63693), TBC1D16 (132726)	69.677	NO	Sin número	Distal
Chr07	45665673	45666172	<i>bmpr1a</i>	5617	chr10	88628023	88628522	MMRN2 (89347), BMPR1A (111866)	77.305	NO	Sin número	Distal
Chr07	28825238	28825737	<i>Xetv90017823m.g</i>	15904	chr15	93785997	93786496	RGMA (169155)	72.174	NO	Sin número	Distal
Chr07	23592024	23592523	<i>ldb1</i>	4824	chr10	103870426	103870925	LDB1 (9534), HPS6 (45529)	84.821	NO	Sin número	Distal
Chr07	21392607	21393106	<i>c10orf2</i>	924	chr10	102750450	102750949	TTC30B (3428), C10orf2 (2917)	82.27	NO	Sin número	Distal
Chr07	18719026	18719525	<i>kndc1</i>	15380	chr10	134980730	134981229	UTF1 (62798), KND1 (7029)	78.199	NO	Sin número	Distal
Chr07	16584651	16585150	<i>lank1</i>	55824	chr10	127759888	127760387	FANK1 (175030), ADAM12 (316886)	78.531	NO	Sin número	Distal
Chr07	14107529	14108028	<i>ebf3</i>	2429	chr10	131640219	131640718	EBF3 (121636), MGMT (375021)	78.723	NO	Sin número	Distal
Chr07	14010748	14011247	<i>ebf3</i>	25268	chr10	131741478	131741977	EBF3 (20377), MGMT (476280)	90.476	NO	Sin número	Distal
Chr07	9824449	9824948	<i>and5b</i>	7849	chr10	63843586	63844085	ARID5B (182777), RTKN2 (184630)	73.333	NO	Sin número	Distal
Chr08	117468561	117469060	<i>nduf52</i>	4391	chr1	161178793	161179292	FCER1G (6044), NDUFS2 (9938)	80.315	NO	Sin número	Distal
Chr08	89958330	89958829	<i>ryr3</i>	183964	chr15	34072230	34072729	CHRM5 (188609), RYR3 (469303)	74.648	NO	Sin número	Distal
Chr08	37697673	37670262	<i>nrk</i>	62146	chr2	102447999	102448498	IL1R2 (160057), MAP4K4 (133706)	82.014	NO	Sin número	Distal
Chr08	23690850	23691349	<i>dig3</i>	736	chrX	69673284	69673783	DLG3 (8715), TEX11 (450227)	81.553	NO	Sin número	Distal
Chr08	15293196	15293695	<i>LOC100485303</i>	3219	chr9	97382464	97382963	FBP2 (26639), FBP1 (19817)	77.778	NO	Sin número	Distal
Chr09	73238539	73239038	<i>zeb2</i>	81928	chr2	145408390	145408889	ZEB2 (130019)	95.238	NO	Sin número	Distal
Chr09	72691264	72691763	<i>Xetv90024446m.g</i>	153304	chr2	146518359	146518858	NONE	84.862	NO	Sin número	Distal
Chr09	61687996	61688495	<i>LOC105948472</i>	36605	chr7	21923276	21923275	CDC7A7 (61726), DNAH11 (341143)	79.436	NO	Sin número	Distal
Chr09	60765507	60766006	<i>Xetv90024234m.g</i>	101480	chr2	178395168	178395667	TTC30B (22324), AGPS (138046)	79.042	NO	Sin número	Distal
Chr09	8306401	8306900	<i>tbl11f</i>	212	chr10	50312793	50313292	LRRCL1 (190766), VSTM4 (10511)	69.231	NO	Sin número	Distal
scaffold_22	353613	354112	<i>dennd1a</i>	61648	chr9	126557613	126558112	DENND1A (134523), CRB2 (439324)	78.689	NO	Sin número	Distal
scaffold_87	516806	517305	<i>flnb</i>	46812	chr3	58087752	58088251	FLNB (93875), DNASE1L3 (112396)	78	NO	Sin número	Distal
Chr01	189851844	189852343	<i>Xetv90003740m.g</i>	51665	chr18	52918818	52919317	CDCDC8 (292329), TCF4 (384117)	76.577	NO	Sin número	Distal
Chr01	189827534	189828033	<i>Xetv90003740m.g</i>	27355	chr18	52967607	52968106	CDCDC8 (341118), TCF4 (335328)	78.963	NO	Sin número	Distal
Chr01	189724446	189724945	<i>Xetv90003740m.g</i>	75733	chr18	53073061	53073560	CDCDC8 (446572), TCF4 (229874)	82.946	NO	Sin número	Distal
Chr01	189583436	189583935	<i>tc4f</i>	26116	chr18	53410885	53411384	TCF4 (107950), TXNL1 (894714)	87.124	NO	Sin número	Distal
Chr01	183510518	183511017	<i>da2b</i>	37915	chr5	39518629	39519128	DAB2 (93607)	75.177	NO	Sin número	Distal
Chr01	180758377	180758876	<i>LOC101734495</i>	7488	chr5	50264052	50264551	ISL1 (41619), PARP8 (301350)	80.556	NO	Sin número	Distal
Chr01	177214247	177214746	<i>pted4f</i>	411	chr5	58571268	58571767	PDE4B (618107), RAB3C (692651)	75.385	NO	Sin número	Distal
Chr01	173225823	173226322	<i>lix1</i>	34304	chr5	96453975	96454474	LIX1 (24351), LNPEP (183057)	71.341	NO	Sin número	Distal
Chr01	171592376	171592875	<i>nr2f1</i>	16791	chr5	92937511	92938010	NR2F1 (18718), POU5F2 (139582)	82.424	NO	Sin número	Distal
Chr01	160139043	160139542	<i>znf608</i>	145981	chr5	124255855	124256284	ZN608 (174917)	74.603	NO	Sin número	Distal
Chr01	123353289	123353788	<i>lancc</i>	23769	chr9	97968455	97968954	FANCC (11279), C9orf3 (446639)	77.674	NO	Sin número	Distal
Chr01	123528706	123529205	<i>lancc</i>	30352	chr9	97963387	97963886	FANCC (116347), C9orf3 (445171)	75	NO	Sin número	Distal
Chr01	121293160	121293659	<i>tle1</i>	51029	chr9	84434259	84434758	SPATA31D1 (169178), TLE1 (130289)	75	NO	Sin número	Distal
Chr01	112207799	112208298	<i>LOC105945258</i>	27632	chr9	14236449	14236948	MPDZ (957136), NFIB (76967)	81.119	NO	Sin número	Distal
Chr01	112192615	112193114	<i>nfb</i>	37804	chr9	14270664	14271163	MPDZ (991351), NFIB (42752)	78.571	NO	Sin número	Distal
Chr01	112179693	112180192	<i>nfb</i>	24882	chr9	14281141	14281640	NFIB (32275)	71.707	NO	Sin número	Distal
Chr01	111910635	111911134	<i>frsm1</i>	19169	chr9	14859087	14859586	CER1 (136622), FREM1 (51656)	64.765	NO	Sin número	Distal
Chr01	108673980	108674479	<i>kif4</i>	101017	chr9	110657339	110657838	KLF4 (405662), ACTL7B (961650)	75.591	NO	Sin número	Distal
Chr01	82900693	82901192	<i>rx2</i>	3175	chr19	60665558	6067057	RANBP3 (88657), RFX2 (4337)	76.064	NO	Sin número	Distal
Chr01	58573024	58573523	<i>LOC105946224</i>	74611	chr4	112494461	112494960	PITX2 (950452), C4orf32 (571842)	70.202	NO	Sin número	Distal
Chr01	57677672	57678171	<i>lef1</i>	21391	chr4	109094444	109094943	RPL34 (447118), LEF1 (5116)	73.125	NO	Sin número	Distal
Chr01	49340903	49341402	<i>Xetv90000945m.g</i>	30262	chr4	145110236	145110735	HIP1 (456887), GYPA (48582)	82.955	NO	Sin número	Distal
Chr01	47854030	47854529	<i>nr3c2</i>	45889	chr4	149297224	149297723	NR3C2 (66198), ARHGAP10 (644260)	72.8	NO	Sin número	Distal
Chr01	30328914	30329413	<i>nas1b</i>	92566	chr4	53878833	53879332	RASL1B (150626), SCFD2 (353159)	75	NO	Sin número	Distal
Chr01	14977580	14978079	<i>atoh8</i>	235	chr2	85980100	85981309	ATOH8 (43)	84.127	NO	Sin número	Distal
Chr02	137122056	137122555	<i>gli1</i>	44728	chrY	13971320	13971819	USP9Y (841590), SLC9B1P1 (446853)	69.811	NO	Sin número	Distal
Chr02	112051429	112051928	<i>LOC105946716</i>	68659	chrY	830822	831321	NONE	72.17	NO	Sin número	Distal
Chr02	111358399	111358898	<i>slc9a7</i>	17821	chrX	46531790	46532289	SLC9A7 (86450), CHST7 (98821)	77.686	NO	Sin número	Distal
Chr02	88743424	88743923	<i>bcas3</i>	54422	chr17	58905200	58905699	TBX2 (571807), BCAS3 (150200)	79.577	NO	Sin número	Distal
Chr02	88575052	88575551	<i>bcas3</i>	222794	chr17	59105865	59106364	TBX2 (371142), BCAS3 (350865)	71.259	NO	Sin número	Distal
Chr02	76946580	76947079	<i>nav2</i>	1092	chr7	983014	983513	ADAP1 (11069), GET4 (67075)	75	NO	Sin número	Distal
Chr02	70408486	70408985	<i>Xetv90005024m.g</i>	72776	chrX	40005556	40006055	ATP6A2 (434354), BCOR (49150)	76.166	NO	Sin número	Distal
Chr02	62803908	62804407	<i>foxp4</i>	59381	chr6	41472772	41473271	FOXP4 (41142), NCR2 (169495)	69.036	NO	Sin número	Distal
Chr02	58064052	58064551	<i>LOC100496959</i>	14448	chr1	38433508	38434007	INPP5B (21035), SF3A3 (22835)	92.079	NO	Sin número	Distal
Chr02	34561289	34561788	<i>asmt</i>	127	chrY	1472071	1472570	NONE	72.816	NO	Sin número	Distal
Chr02	27503884	27504383	<i>hic1</i>	82970	chr17	2075357	2075856	SRR (131391), HIC1 (116003)	72.763	NO	Sin número	Distal
Chr02	23072037	23072536	<i>mir99</i>	48747	chr21	17791450	17791949	USP25 (689356)	83.468	NO	Sin número	Distal
Chr02	22952711	22953210	<i>usp25</i>	112213	chr21	17444972	17445471	USP25 (342878)	77.391	NO	Sin número	Distal
Chr02	21246827	21247326	<i>LOC105946601</i>	105708	chr3	78871938	78872437	ROBO1 (944777)	84.328	NO	Sin número	Distal
Chr02	9845686	9846185	<i>run1c</i>	3875	chr21	36217925	36218424	CLIC6 (176487), RUNX1 (203466)	76.238	NO	Sin número	Distal
Chr02	7712782	7713281	<i>wrb</i>	5425	chr21	40762478	40762977	WRB (10558), LCA5L (54931)	79.845	NO	Sin número	Distal
Chr03	114579323	114579822	<i>LOC105946758</i>	248579	chr8	36937896	36938395	ZNFX3 (615123), KGNU1 (296254)	71.429	NO	Sin número	Distal
Chr03	103855360	103855859	<i>Xetv90008968m.g</i>	60209	chr15	96702278	96702777	NR2F2 (171418)	79.032	NO	Sin número	Distal
Chr03	103545623	103546122	<i>Xetv90008968m.g</i>	369946	chr15	96147923	96148422	NR2F2 (725773)	83.529	NO	Sin número	Distal
Chr03	102987132	102987631	<i>mcp2</i>	66974	chr15	94954437	94954936	MCTP2 (113192)	79.351	NO	Sin número	Distal
Chr03	96678969	96679468	<i>LOC100490752</i>	17684	chr15	81643881	81644380	STARD5 (27665), TMC3 (22423)	76.106	NO	Sin número	Distal
Chr03	93926841	93927340	<i>flm1</i>	42681	chr15	48828966	48829465	FBN1 (108830), DUT (205596)	79.108	NO	Sin número	Distal
Chr03	90017713	90018212	<i>tcf12</i>	18219	chr15	57545666	57546165	CNGL1 (122787), TCF12 (335095)	75.556	NO	Sin número	Distal
Chr03	88619671	88620170	<i>LOC106461716</i>	81085	chr15	71839377	71839876	SENP8 (569564), THSD4 (450337)	71.575	NO	Sin número	Distal
Chr03	70732627	70733126	<i>sema3a</i>	1046	chr7	83824143	83824642	SEMA3A (176)	71.848	NO	Sin número	Distal
Chr03	58166497	58166996	<i>ifc</i>	118803	chr7	115317982	115318481	TFEC (352563), MDIF (756023)	89.401	NO	Sin número	Distal
Chr03	51540485	51540984	<i>krcn2</i>	10674	chr2	191230260	191230759	MFS6 (42571), INPP1 (22314)	68.243	NO	Sin número	Distal
Chr03	33233348	33233847	<i>LOC100489578</i>	52174	chr5	173811509	173812008	MSX2 (339777), ENSG00000170091 (339152)	7			

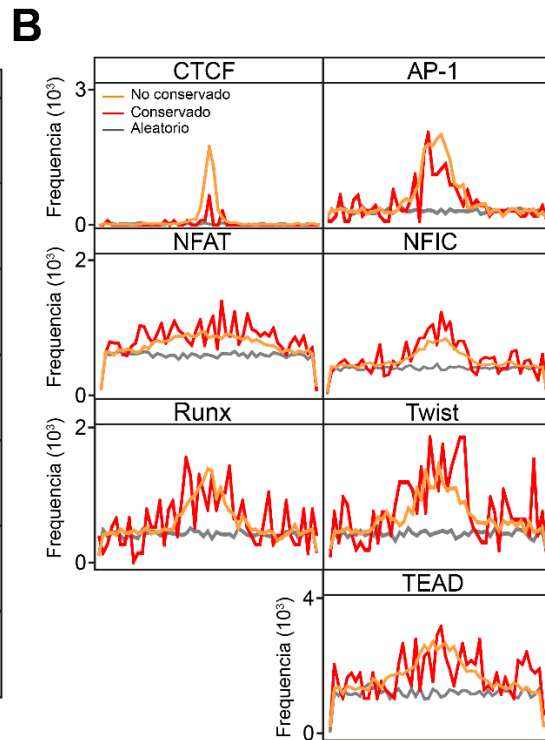
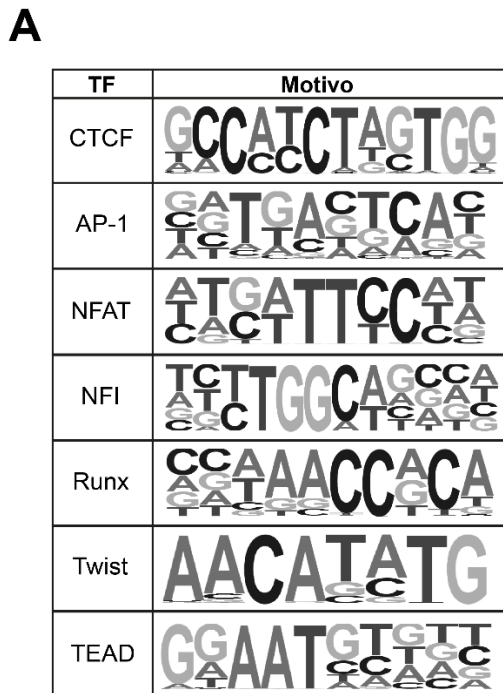
Chr05	6416944	6417443	<i>Xetov90013038m.g</i>	138457	chr1	221390419	221390918	HLX (338970), DUSP10 (524849)	77.064	NO	Sin número	Distal
Chr06	122012411	122012910	<i>Xetov90017135m.g</i>	24908	chr8	119004545	119005044	EXT1 (119297), MED30 (471843)	74.38	NO	Sin número	Distal
Chr06	120820427	120820926	<i>tps1</i>	83960	chr8	116452947	116453446	TRPS1 (228031)	71.585	NO	Sin número	Distal
Chr06	120403079	120403578	<i>Xetov90017126m.g</i>	41826	chr8	114448868	114449367	CSMD3 (210)	76.562	NO	Sin número	Distal
Chr06	113983315	113983814	<i>stk3</i>	37406	chr8	99693940	99694439	KCNS2 (254940), STK3 (260609)	75.065	NO	Sin número	Distal
Chr06	107643098	107643597	<i>LOC106647929</i>	10122	chr8	77723531	77724030	ZFXH4 (130327), PEX2 (189499)	82.129	NO	Sin número	Distal
Chr06	105142517	105143160	<i>sulf1</i>	48385	chr8	70585222	70585721	SLOCOSA1 (161827), SULF1 (206613)	84.239	NO	Sin número	Distal
Chr06	103678622	103679121	<i>pde7a</i>	907	chr8	66691749	66692248	PDE7A (62188), MTRF1 (135025)	80.488	NO	Sin número	Distal
Chr06	103423350	103423849	<i>cyp7b1</i>	24115	chr8	65659005	65659504	CYP7B1 (53063), BHLHE22 (165441)	76.515	NO	Sin número	Distal
Chr06	98425026	98425525	<i>LOC100488828</i>	54549	chr8	49181634	49182133	UBE2V2 (260924), EFCAB1 (465907)	74.603	NO	Sin número	Distal
Chr06	75457577	75458076	<i>rbms3</i>	5877	chr3	29328183	29328682	RBMS3 (6596)	72.519	NO	Sin número	Distal
Chr06	69046506	69047005	<i>Xetov90016334m.g</i>	5858	chr7	51201539	51202038	GRB10 (401739), COBL (182707)	72.807	NO	Sin número	Distal
Chr06	66812887	66813386	<i>LOC106647886</i>	135561	chr7	41087307	41087806	INHBA (655149), SUGCT (912982)	81.437	NO	Sin número	Distal
Chr06	52203568	52204067	<i>Xetov90016160m.g</i>	38002	chr6	2559453	2559952	GMDS (313777), MYLK4 (191497)	76.991	NO	Sin número	Distal
Chr06	52061201	52061700	<i>gmds</i>	15405	chr6	2111511	2112010	GMDS (134165), FOXC1 (501080)	73.005	NO	Sin número	Distal
Chr06	51681497	51681996	<i>fox2</i>	30141	chr6	1397030	1397529	FOXC1 (213401), FOXF2 (7211)	83.448	NO	Sin número	Distal
Chr06	43816691	43817190	<i>hdac9</i>	25141	chr7	18733393	18733892	HDAC9 (197717), TWIST1 (423652)	75.568	NO	Sin número	Distal
Chr06	43425144	43425643	<i>twistnb</i>	60203	chr7	19547687	19548186	FERD3L (362893), TWISTNB (200773)	81.287	NO	Sin número	Distal
Chr06	31380763	31381262	<i>ddc2</i>	36682	chr6	24274486	24274985	KAAG1 (251376), NRSN1 (148386)	77.358	NO	Sin número	Distal
Chr06	30776415	30776914	<i>Xetov90015872m.g</i>	70729	chr6	21845098	21845597	SOX4 (621376), PRL (452382)	78.219	NO	Sin número	Distal
Chr06	16085807	16086306	<i>Xetov90015654m.g</i>	21900	chr10	28530594	28531093	ARMC4 (242867), MPP7 (38227)	74.691	NO	Sin número	Distal
Chr06	12095106	12095605	<i>pkfp</i>	20314	chr12	48531366	48531865	ASB8 (19792), PFKM (31880)	76.923	NO	Sin número	Distal
Chr07	106661914	106662413	<i>cyh1</i>	9905	chr19	48973418	48973917	CYTH2 (1379), LMTK3 (42778)	83.036	NO	Sin número	Distal
Chr07	94305029	94305528	<i>Xetov90018937m.g</i>	56717	chr1	2792584	2793083	MME1L (228480), ACTRT2 (145212)	93.243	NO	Sin número	Distal
Chr07	88138841	88139340	<i>sor1</i>	93779	chr11	121542594	121543093	SORL1 (219932), BLID (444079)	81.25	NO	Sin número	Distal
Chr07	88121968	88122467	<i>sor1</i>	110652	chr11	121665848	121666347	BLID (320825), SORL1 (343186)	74.194	NO	Sin número	Distal
Chr07	78075633	78076132	<i>pph</i>	11020	chr1	43131444	43131943	YBX1 (16404), PPH (7598)	85.294	NO	Sin número	Distal
Chr07	73555155	73555654	<i>zbtb16</i>	47980	chr11	11403568	114035067	NMNT (93735), ZBTB16 (104503)	85.827	NO	Sin número	Distal
Chr07	66639625	66640124	<i>fl1</i>	21709	chr11	128636063	128636562	FLI1 (72648), KCNJ1 (76116)	76.562	NO	Sin número	Distal
Chr07	65276897	65277396	<i>tmem218</i>	80726	chr11	125034409	125034908	PKNOX2 (57)	86.614	NO	Sin número	Distal
Chr07	40871306	40871805	<i>slc29a3</i>	34057	chr10	73050504	73051003	SLC29A3 (28261), UNC5B (78427)	74.863	NO	Sin número	Distal
Chr07	31140810	31141309	<i>Xetov90017880m.g</i>	19532	chr10	97141247	97141746	PDLM1 (90716), SORBS1 (179638)	79.2	NO	Sin número	Distal
Chr07	24794038	24794537	<i>hoga1</i>	215	chr10	99344370	99344869	C10orf62 (4830), ENSG00000249967 (489), HOGA1 (620)	74.359	NO	Sin número	Distal
Chr07	7638413	7638912	<i>bic1</i>	102832	chr10	60573414	60573913	PHYHIP1 (362696), BICC1 (300764)	70.807	NO	Sin número	Distal
Chr08	107829261	107829760	<i>Xetov90022182m.g</i>	8950	chr1	150128909	150129408	PLEKH01 (6899), ANP3E2 (79345)	87.5	NO	Sin número	Distal
Chr08	83178771	83179270	<i>itim9</i>	58400	chr14	59000044	59000543	TIMM3 (105962), DACT1 (104603)	86.792	NO	Sin número	Distal
Chr08	74421926	74422425	<i>sam40a</i>	56980	chr14	55153012	55153511	SAMD4A (118627), GCH1 (216308)	70.833	NO	Sin número	Distal
Chr08	69434833	69435332	<i>bcl11b</i>	7304	chr14	99658314	99658813	BCL11B (79001)	77.128	NO	Sin número	Distal
Chr08	69200428	69200927	<i>LOC105948166</i>	167451	chr14	99082882	99083381	BCL11B (654433)	74.603	NO	Sin número	Distal
Chr08	68959871	68960370	<i>LOC106648392</i>	347698	chr14	98444331	98444830	NONE	84.052	NO	Sin número	Distal
Chr08	67517258	67517757	<i>Xetov90021261m.g</i>	6718	chr14	95538719	95539218	GSC (302407), DICER1 (85378)	91.992	NO	Sin número	Distal
Chr08	66112192	66112691	<i>lcn2</i>	1947	chr14	92253671	92254170	CATSPERB (55491), TC2N (79952)	75.893	NO	Sin número	Distal
Chr08	65274921	65275420	<i>foxn3</i>	10252	chr14	89866003	89866502	FOXN3 (219221), TTC8 (575247)	82.171	NO	Sin número	Distal
Chr08	63298224	63298723	<i>Xetov90021174m.g</i>	18751	chr14	84561836	84562335	NONE	74.809	NO	Sin número	Distal
Chr08	36004969	36005468	<i>Xetov90020487m.g</i>	38360	chrX	147878068	147878305	AFX2 (295917), IDS (708821)	77.5	NO	Sin número	Distal
Chr08	4809066	4809565	<i>LOC101732031</i>	80376	chr9	132244656	132245155	NTMT1 (162655), PPP2R4 (371311)	84.615	NO	Sin número	Distal
Chr09	73373916	73373915	<i>Xetov90024453m.g</i>	43486	chr2	144581405	144581904	GTDC1 (411652), ARHGAP15 (694772)	77.528	NO	Sin número	Distal
Chr09	73379394	73379893	<i>LOC106648847</i>	23854	chr2	145224037	145224536	GTDC1 (230980), ZEB2 (54334)	78.049	NO	Sin número	Distal
Chr09	64774561	64780060	<i>tank</i>	61788	chr2	161767140	161767639	RBMS1 (417085), TANK (249418)	81.768	NO	Sin número	Distal
Chr09	39929941	39930440	<i>col3a1</i>	65951	chr2	189757294	189757793	COL3A1 (81502), GULP1 (599985)	79.661	NO	Sin número	Distal
Chr09	16766648	16767147	<i>cog7</i>	5196	chr16	23453604	23454103	COG7 (10647), SCNN1B (140263)	74.194	NO	Sin número	Distal
Chr10	27151901	27152400	<i>nfat2</i>	28756	chr20	50063827	50064326	KCNK1 (424411), NFATC2 (95181)	70.109	NO	Sin número	Distal
Chr10	2544222	25442721	<i>cbf4</i>	255	chr18	70209899	70209498	CBLN2 (2535)	79.487	NO	Sin número	Distal
scaffold_169	356047	356546	<i>Xetov90026711m.g</i>	16412	chr10	119434073	119434572	EMX2 (132368), RAB11FIP2 (371791)	86.822	NO	Sin número	Distal
scaffold_21	305259	305758	<i>mhp</i>	24864	chr7	11201346	11201935	PHF14 (188187), THSD7A (670138)	74.038	NO	Sin número	Distal
scaffold_614	38084	38583	<i>NA</i>	474	chr4	124391666	124392165	SPRY1 (71251)	90.244	NO	Sin número	Distal
scaffold_73	540091	540590	<i>slc25a13</i>	72399	chr7	95691171	95691670	SLC25A13 (260038), DYNC11 (289519)	76.296	NO	Sin número	Distal
scaffold_73	464265	464764	<i>LOC101732031</i>	51310	chr7	95580815	95581314	DYNC11 (191763), SLC25A13 (370394)	72.5	NO	Sin número	Distal
scaffold_90	241049	241548	<i>setpb1</i>	24834	chr18	42596312	42596811	SLC14A2 (598204), SETPB1 (335699)	83.735	NO	Sin número	Distal
Chr01	174898784	174899283	<i>nln</i>	51	chr5	65118417	65118916	ERBB2IP (103934), NLN (100644)	77.165	NO	Sin número	SIT
Chr01	93468767	93469266	<i>mapk10</i>	70	chr4	87280962	87281461	MAPK10 (4)	80.913	NO	Sin número	SIT
Chr01	43486762	43487261	<i>page2</i>	54	chr4	160188629	160189128	RAPGEF2 (10)	75.524	NO	Sin número	SIT
Chr02	159103339	159103838	<i>c11orf70</i>	96	chr11	101953615	101954114	ANGPTL5 (166612), YAP1 (27327)	70.909	NO	Sin número	SIT
Chr02	130591828	130592327	<i>kctd4</i>	43	chr13	45769609	45769108	KCTD4 (6316), GTF2F2 (74209)	76.282	NO	Sin número	SIT
Chr02	117357113	117357612	<i>LOC106648505</i>	65	chr13	100623657	100624156	ZIC5 (256)	72.505	NO	Sin número	SIT
Chr03	39729471	39729970	<i>igf1</i>	73	chr12	102874127	102874626	IGF1 (36)	89.919	NO	Sin número	SIT
Chr06	32928923	32929422	<i>hoxa4</i>	61	chr17	46655541	46656040	HOXB3 (24507), HOXB4 (1682)	75	NO	Sin número	SIT
Chr08	72143108	72143607	<i>sav1</i>	45	chr14	51101761	51102260	SAV1 (33038), ATL1 (75268)	80	NO	Sin número	SIT
scaffold_37	849383	849882	<i>apd1</i>	72	chr20	61364835	61365334	MRGBP (62720), NTSR1 (24896)	73.529	NO	Sin número	SIT
Chr01	177081378	177081877	<i>pde4d</i>	57	chr5	58883220	58883719	PDE4D (306155)	77.419	NO	Sin número	SIT
Chr01	132563435	132563934	<i>emid1</i>	183	chr8	24465920	24465789	NEFM (304985), ADAM7 (167001)	71.97	NO	Sin número	SIT
Chr01	106482932	106483431	<i>adamts1</i>	111	chr9	18473869	18474368	ADAMTS1 (227)	77.099	NO	Sin número	SIT
Chr01	63482294	63482793	<i>cxco4</i>	54	chr4	105416041	105416540	CXCC4 (240)	85.305	NO	Sin número	SIT
Chr01	33329463	33329962	<i>ntus1</i>	40	chr8	17554647	17555146	MTUS1 (103280), PDGFRL (120955)	75.207	NO	Sin número	SIT
Chr02	136903408	136903907	<i>r3hdm2</i>	86	chr12	57735945	57736444	STAC				

A

Muestra	RIN
Mesénquima rep2	8,7
Osteoblastos rep1	8,3
Osteoblastos rep2	9,4
Regeneración 5dpl rep1	9,7
Regeneración 5dpl rep2	9,2
Regeneración 15dpl rep1	8,4
Regeneración 15dpl rep2	8,2
Higado rep1	8,2
Higado rep2	10



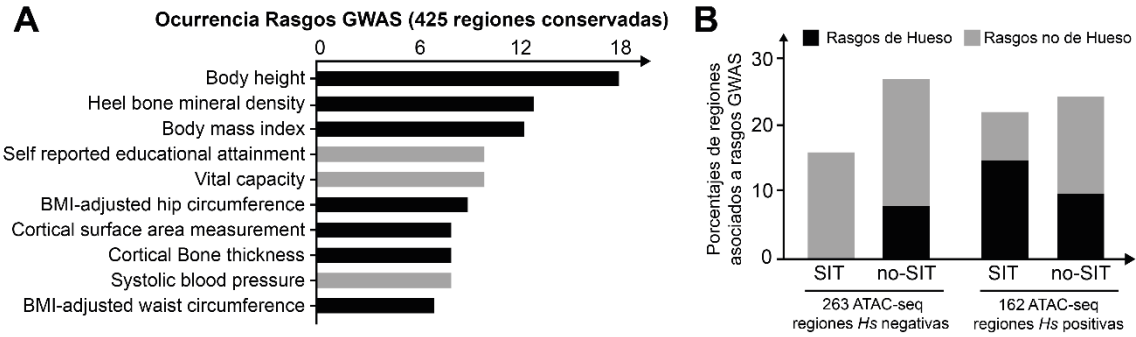
Anexo 4. Calidad del ARN extraído. **(A)** RIN (*RNA Integrity Number*) de cada una de las muestras de ARN secuenciadas. **(B)** Perfil de Osteoblastos rep2, ejemplificando los resultados obtenidos mediante el bioanalyzer, donde se visualizan los picos de señal del ARN ribosomal 18S y 28S.



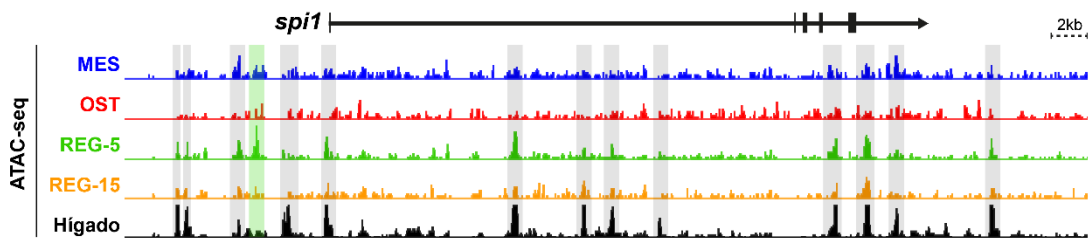
Anexo 5. Comparación del enriquecimiento de TFBS entre regiones distales osteoblasto-específicas conservadas y no conservadas. **(A)** Secuencias de los TFBS enriquecidos en osteoblastos de *Xt*. **(B)** Comparación del enriquecimiento de TFBS en regiones no-SIT osteoblasto-específicas entre el conjunto de 367 regiones de *Xt* conservadas con humanos (rojo), el conjunto de 6.380 regiones de *Xt* sin conservación de secuencia con humanos, pollos y tiburones elefante (naranja) y el control aleatorio (gris). Nótese el enriquecimiento mucho mayor de sitios de unión para CTCF en las regiones no conservadas.

Cromosoma	SNP_hg38	gen	rsID	GWAS: rasgo asociado a hueso
chr1	170511151	PRRX1 (-610)	rs10800526	BMI-adjusted_waist-hip_ratio;adolescent_idiopathic_scoliosis
chr1	170511390	PRRX1 (-610)	rs10919423	BMI-adjusted_waist-hip_ratio;adolescent_idiopathic_scoliosis
chr2	33134390	RASGRP3 (341814), LTBP1 (+187442)	rs12620839	body_height
chr2	33134498	RASGRP3 (341814), LTBP1 (+187442)	rs116713089	BMI-adjusted_hip_circumference;body_weight
chr2	111123023	BCL2L11 (2333), ANAPC1 (761428)	rs7602904	body_height;heel_bone_mine
chr2	111123046	BCL2L11 (2333), ANAPC1 (761428)	rs1821968	BMI-adjusted_waist-hip_ratio;BMI-adjusted_waist_circumference
chr2	226031347	NYAP2 (+630484), IRS1 (+768627)	rs1105542	BMI-adjusted_waist-hip_ratio;BMI-adjusted_waist_circumference
chr2	239328761	HDAC4 (72055), TWIST2 (493915)	rs7594398	heel_bone_mineral_density
chr4	123284507	SPRY1 (-115127), SPATA5 (+361309)	rs302543	body_height;cortical_surface_area_measurement
chr5	66828518	MAST4 (232361), CD180 (368077)	rs56125086	cortical_surface_area_measurement
chr5	124920278	ZNF608 (-174917)	rs17448900	cortical_surface_area_measurement
chr5	124920569	ZNF608 (-174917)	rs1026010	body_mass_index
chr6	45201877	RUNX2 (-126642), CDC5L (+814202)	rs4714842	BMI-adjusted_hip_circumference;BMI-adjusted_waist_circumference
chr6	45327985	RUNX2 (-176)	rs59983488	BMI-adjusted_hip_circumference;BMI-adjusted_waist_circumference
chr7	19508072	FERD3L (-362893), TWISTNB (+200773)	rs76423993	BMI-adjusted_waist_circumference;body_height
chr7	19508159	FERD3L (-362893), TWISTNB (+200773)	rs80175716	BMI-adjusted_waist_circumference;body_height
chr7	28685919	CHN2 (508377), CREB5 (273507)	rs757980	heel_bone_mineral_density
chr7	42232498	INHBA (-529420), GLI3 (+4486)	rs10951676	BMI-adjusted_hip_circumference
chr7	92698451	FAM133B (-107960), CDK6 (+135563)	rs3731321	BMI-adjusted_hip_circumference;body_height
chr8	60821736	CLVS1 (-465985), CHD7 (+143192)	rs4509369	body_height
chr8	75553287	HNF4G (+13276)	rs1800924	body_mass_index
chr8	76849683	PEX2 (+151432), ZFX4 (+168394)	rs61729527	body_height
chr8	115464584	TRPS1 (204308)	rs1180624	body_height;body_mass_index
chr9	15936530	PSIP1 (425466), BNC2 (934221)	rs10962225	body_height;body_mass_index;cortical_thickness
chr9	16628021	BNC2 (+242604)	rs79538366	body_mass_index
chr9	16628249	FANCC (-144836), PTCH1 (+46123)	rs76753553	body_mass_index
chr9	95462774	ARMC4 (242867), MPP7 (38227)	rs28377268	hip_bone_mineral_density;spine_bone_mineral_density
chr10	28242122	LRRC18 (190766), VSTM4 (10511)	rs12354769	heel_bone_mineral_density
chr10	49104830	LRRC18 (190766), VSTM4 (10511)	rs144023297	body_height;body_mass_index;cortical_thickness
chr10	49104886	MMRN2 (89347), BMPR1A (111866)	rs10572484	cortical_bone_thickness
chr10	86868594	MMRN2 (89347), BMPR1A (111866)	rs11202239	heel_bone_mineral_density
chr10	86868609	NNMT (94794), ZBTB16 (103444)	rs10788530	BMI-adjusted_waist_circumference
chr11	114160077	NNMT (94794), ZBTB16 (103444)	rs648044	cortical_bone_thickness
chr11	114160370	TUBA1A (273)	rs636406	body_mass_index
chr12	49188909	HMG2 (393027), MSRB3 (152461)	rs1039225	comparative_body_size_at_age_10_self-reported
chr12	65430890	HMG2 (393027), MSRB3 (152461)	rs1494502	cortical_bone_thickness;odontogenesis;waist-hip_ratio
chr12	65431066	FBLN5 (298)	rs1389799	odontogenesis;tooth_eruption;waist-hip_ratio
chr14	91947643	FBN1 (108830), DUT (205596)	rs7149187	BMI-adjusted_hip_circumference;heel_bone_mineral_density
chr15	48537064	AKTIP (-161922), RPGRIP1L (+38673)	rs12595269	heel_bone_mineral_density
chr16	53665091	SRR (-88046), HIC1 (+159348)	rs4133017	body_mass_index;body_mass_index
chr17	2179582	SRR (88046), HIC1 (159348)	rs35841700	BMI-adjusted_hip_circumference; osteoarthritis_knee;waist-hip_ratio
chr17	2215807	TBX2 (458640), BCAS3 (263367)	rs11655813	bone_density;osteoarthritis_knee;waist-hip_ratio
chr17	60941491	TBX2 (458640), BCAS3 (263367)	rs9912474	heel_bone_mineral_density
chr17	60941494	TMEM105 (63417), ACTG1 (111916)	rs9912055	heel_bone_mineral_density
chr17	81394096	SLC14A2 (-598204), SETBP1 (+335699)	rs8067402	body_height; dental_caries_dentures;dentures
chr18	45016726	SLC14A2 (-598204), SETBP1 (+335699)	rs200216047	body_mass_index;body_weight
chr18	45016824	TCF4 (-107950), TXNL1 (+894741)	rs11874246	body_height;body_mass_index;body_weight
chr18	55743681	JAG1 (+54389), SLX4IP (+184354)	rs12458596	BMI-adjusted_waist-hip_ratio
chr20	10619788	USP25 (689356)	rs1232598	body_height;vital_capacity

Anexo 6. Tabla que muestra la superposición entre los RLN osteoblasto-específicos conservados con humano, los SNPs de GWAS y sus rasgos relacionados con hueso.



Anexo 7. Resumen de los análisis GWAS. **(A)** Los 10 rasgos más frecuentes en los estudios GWAS resultantes de las 425 RLN conservadas entre la rana y el humano. Los rasgos relacionados con el esqueleto se muestran en negro. **(B)** Porcentaje de regiones SIT y no-SIT relacionadas con un rasgo esquelético (negro) o con un rasgo no esquelético (gris) según los estudios GWAS. Se muestran las RLN que carecen (izquierda) o poseen (derecha) un pico de ATAC-seq en osteoblastos humanos.



Anexo 8. Perfiles de cromatina abierta en el locus de *spi1*. Los picos ATAC-seq del hígado están indicados con rectángulos grises, mientras que el pico ATAC-seq específico de Regeneración 5dpl (miembro del Clúster III) está destacado con un rectángulo verde.

8. REFERENCIAS

- [1] C. Bucciarelli and M. Selbach, “mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control,” 2020, doi: 10.1038/s41576-020-0258-4.
- [2] M. González-Barrios *et al.*, “Cis- and trans-regulatory mechanisms of gene expression in the ASJ sensory neuron of *Caenorhabditis elegans*,” *Genetics*, vol. 200, no. 1, pp. 123–134, Jan. 2015, doi: 10.1534/GENETICS.115.176172/-/DC1/GENETICS.115.176172-2.PDF.
- [3] S. L. Klemm, Z. Shipony, and W. J. Greenleaf, “Chromatin accessibility and the regulatory epigenome,” *Nature Reviews Genetics* 2018 20:4, vol. 20, no. 4, pp. 207–220, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41576-018-0089-8.
- [4] N. J. Fuda, M. B. Ardehali, and J. T. Lis, “Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo,” *Nature* 2009 461:7261, vol. 461, no. 7261, pp. 186–192, Sep. 2009, doi: 10.1038/nature08449.
- [5] P. Cramer, “Organization and regulation of gene transcription,” *Nature* 2019 573:7772, vol. 573, no. 7772, pp. 45–54, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1517-4.
- [6] R. Andersson and A. Sandelin, “Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements,” *Nature Reviews Genetics* 2019 21:2, vol. 21, no. 2, pp. 71–87, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41576-019-0173-8.
- [7] M. Gasperini, J. M. Tome, and J. Shendure, “Towards a comprehensive catalogue of validated and target-linked human enhancers,” *Nat Rev Genet*, vol. 21, no. 5, p. 292, May 2020, doi: 10.1038/S41576-019-0209-0.
- [8] S. Heinz, C. E. Romanoski, C. Benner, and C. K. Glass, “The selection and function of cell type-specific enhancers,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 16, no. 3, p. 144, Mar. 2015, doi: 10.1038/NRM3949.
- [9] S. S. Maurya, “Role of Enhancers in Development and Diseases,” *Epigenomes*, vol. 5, no. 4, Dec. 2021, doi: 10.3390/EPIGENOMES5040021.
- [10] A. Sloutskin, H. Shir-Shapira, R. N. Freiman, and T. Juven-Gershon, “The Core Promoter Is a Regulatory Hub for Developmental Gene Expression,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 666508, Sep. 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.666508/BIBTEX.
- [11] V. Haberle and A. Stark, “Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 19:10, vol. 19, no. 10, pp. 621–637, Jun. 2018, doi: 10.1038/s41580-018-0028-8.
- [12] S. J. Van Heeringen, W. Akhtar, U. G. Jacobi, R. C. Akkers, Y. Suzuki, and G. J. C. Veenstra, “Nucleotide composition-linked divergence of vertebrate core promoter architecture,” *Genome Res*, vol. 21, no. 3, p. 410, Mar. 2011, doi: 10.1101/GR.111724.110.
- [13] L. Vo ngoc, C. Y. Huang, C. J. Cassidy, C. Medrano, and J. T. Kadonaga, “Identification of the human DPR core promoter element using machine learning,” *Nature* 2020 585:7825, vol. 585, no. 7825, pp. 459–463, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2689-7.

- [14] X. Chen *et al.*, “Structural insights into preinitiation complex assembly on core promoters,” *Science (1979)*, vol. 372, no. 6541, Apr. 2021, doi: 10.1126/SCIENCE.ABA8490/SUPPL_FILE/ABA8490S31.MP4.
- [15] R. Fenouil *et al.*, “CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters,” *Genome Res*, vol. 22, no. 12, p. 2399, Dec. 2012, doi: 10.1101/GR.138776.112.
- [16] A. Angeloni and O. Bogdanovic, “Sequence determinants, function, and evolution of CpG islands,” *Biochem Soc Trans*, vol. 49, no. 3, p. 1109, Jun. 2021, doi: 10.1042/BST20200695.
- [17] S. R. Hartono, I. F. Korf, F. Fr´, F. Fr´ed´, F. Ch´edin, and C. Ch´edin, “GC skew is a conserved property of unmethylated CpG island promoters across vertebrates,” *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no. 20, pp. 9729–9741, Nov. 2015, doi: 10.1093/NAR/GKV811.
- [18] P. A. Ginno, P. L. Lott, H. C. Christensen, I. Korf, and F. Ch´edin, “R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters,” *Mol Cell*, vol. 45, no. 6, pp. 814–825, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.017.
- [19] T. H. Beacon *et al.*, “The dynamic broad epigenetic (H3K4me3, H3K27ac) domain as a mark of essential genes,” *Clinical Epigenetics 2021 13:1*, vol. 13, no. 1, pp. 1–17, Jul. 2021, doi: 10.1186/S13148-021-01126-1.
- [20] W. Zhao *et al.*, “Investigating crosstalk between H3K27 acetylation and H3K4 trimethylation in CRISPR/dCas-based epigenome editing and gene activation,” *Scientific Reports 2021 11:1*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-95398-5.
- [21] J. W. Wragg, L. Roos, D. Vucenovic, N. Cvetic, B. Lenhard, and F. Muller, “Embryonic tissue differentiation is characterized by transitions in cell cycle dynamic-associated core promoter regulation,” *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 15, pp. 8374–8392, Sep. 2020, doi: 10.1093/NAR/GKAA563.
- [22] A. Mora, K. Sandve, and R. Eskeland, “In the loop: promoter-enhancer interactions and bioinformatics,” 2016, doi: 10.1093/bib/bbv097.
- [23] S. Kim and J. Wysocka, “Deciphering the multi-scale, quantitative cis-regulatory code,” *Mol Cell*, vol. 83, pp. 373–392, 2023, doi: 10.1016/j.molcel.2022.12.032.
- [24] M. A. J. Morgan and A. Shilatifard, “Reevaluating the roles of histone-modifying enzymes and their associated chromatin modifications in transcriptional regulation,” *Nature Genetics 2020 52:12*, vol. 52, no. 12, pp. 1271–1281, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41588-020-00736-4.
- [25] S. Pundhir, F. O. Bagger, F. B. Lauridsen, N. Rapin, and B. T. Porse, “Peak-valley-peak pattern of histone modifications delineates active regulatory elements and their directionality,” *Nucleic Acids Res*, vol. 44, no. 9, pp. 4037–4051, May 2016, doi: 10.1093/NAR/GKW250.

- [26] P. R. Arnold, A. D. Wells, and X. C. Li, "Diversity and Emerging Roles of Enhancer RNA in Regulation of Gene Expression and Cell Fate," *Front Cell Dev Biol*, vol. 7, p. 503820, Jan. 2020, doi: 10.3389/FCCELL.2019.00377/BIBTEX.
- [27] C. P. Fulco *et al.*, "Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference," *Science (1979)*, vol. 354, no. 6313, pp. 769–773, Nov. 2016, doi: 10.1126/SCIENCE.AAG2445.
- [28] A. Field and K. Adelman, "Evaluating Enhancer Function and Transcription," 2020, doi: 10.1146/annurev-biochem-011420.
- [29] E. Z. Kvon *et al.*, "Genome-scale functional characterization of Drosophila developmental enhancers in vivo," *Nature 2014 512:7512*, vol. 512, no. 7512, pp. 91–95, Jun. 2014, doi: 10.1038/nature13395.
- [30] S. Schoenfelder and P. Fraser, "Long-range enhancer–promoter contacts in gene expression control," *Nature Reviews Genetics 2019 20:8*, vol. 20, no. 8, pp. 437–455, May 2019, doi: 10.1038/s41576-019-0128-0.
- [31] L. A. Lettice *et al.*, "A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly," *Hum Mol Genet*, vol. 12, no. 14, pp. 1725–1735, Jul. 2003, doi: 10.1093/HMG/DDG180.
- [32] S. S. Gisselbrecht *et al.*, "Transcriptional silencers in Drosophila serve a dual role as transcriptional enhancers in alternate cellular contexts," *Mol Cell*, vol. 77, no. 2, p. 324, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2019.10.004.
- [33] J. C. McGann *et al.*, "Polycomb- and REST-associated histone deacetylases are independent pathways toward a mature neuronal phenotype," *Elife*, vol. 3, p. e04235, 2014, doi: 10.7554/ELIFE.04235.
- [34] X. Ren and T. K. Kerppola, "REST Interacts with Cbx Proteins and Regulates Polycomb Repressive Complex 1 Occupancy at RE1 Elements," *Mol Cell Biol*, vol. 31, no. 10, p. 2100, May 2011, doi: 10.1128/MCB.05088-11.
- [35] J. A. Segert, S. S. Gisselbrecht, and M. L. Bulyk, "Transcriptional silencers: driving gene expression with the brakes on," *Trends Genet*, vol. 37, no. 6, p. 514, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.TIG.2021.02.002.
- [36] D. Huang, H. M. Petrykowska, B. F. Miller, L. Elnitski, and I. Ovcharenko, "Identification of human silencers by correlating cross-tissue epigenetic profiles and gene expression," *Genome Res*, vol. 29, no. 4, pp. 657–667, Apr. 2019, doi: 10.1101/GR.247007.118/-/DC1.
- [37] H. Ochi, T. Tamai, H. Nagano, A. Kawaguchi, N. Sudou, and H. Ogino, "Evolution of a tissue-specific silencer underlies divergence in the expression of pax2 and pax8 paralogues," *Nature Communications 2012 3:1*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, May 2012, doi: 10.1038/ncomms1851.

- [38] H. Huang *et al.*, “CTCF mediates dosage-and sequence-context-dependent transcriptional insulation by forming local chromatin domains HHS Public Access Author manuscript,” *Nat Genet*, vol. 53, no. 7, pp. 1064–1074, 2021, doi: 10.1038/s41588-021-00863-6.
- [39] T. Xiao, X. Li, and G. Felsenfeld, “The Myc-associated zinc finger protein (MAZ) works together with CTCF to control cohesin positioning and genome organization,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 118, no. 7, p. e2023127118, Feb. 2021, doi: 10.1073/PNAS.2023127118/SUPPL_FILE/PNAS.2023127118.SAPP.PDF.
- [40] H. Ortabozkoyun *et al.*, “CRISPR and biochemical screens identify MAZ as a cofactor in CTCF-mediated insulation at Hox clusters,” *Nature Genetics* 2022 54:2, vol. 54, no. 2, pp. 202–212, Feb. 2022, doi: 10.1038/s41588-021-01008-5.
- [41] I. F. Davidson *et al.*, “CTCF is a DNA-tension-dependent barrier to cohesin-mediated loop extrusion,” *Nature* 2023 616:7958, vol. 616, no. 7958, pp. 822–827, Apr. 2023, doi: 10.1038/s41586-023-05961-5.
- [42] W. A. Flavahan *et al.*, “Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas Gain-of-function IDH mutations are initiating events that define major clinical and prognostic classes of gliomas 1,2. Mutant IDH protein produces,” *Nature*, 2016, doi: 10.1038/nature16490.
- [43] S. Nishimoto, C. Minguillon, S. Wood, and M. P. O. Logan, “A Combination of Activation and Repression by a Colinear Hox Code Controls Forelimb-Restricted Expression of Tbx5 and Reveals Hox Protein Specificity,” *PLoS Genet*, vol. 10, no. 3, p. e1004245, 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1004245.
- [44] L. Christiaen, A. Stolfi, B. Davidson, and M. Levine, “Spatio-temporal intersection of Lhx3 and Tbx6 defines the cardiac field through synergistic activation of Mesp,” *Dev Biol*, vol. 328, no. 2, pp. 552–560, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.YDBIO.2009.01.033.
- [45] V. Bertrand, C. Hudson, D. Caillol, C. Popovici, and P. Lemaire, “Neural Tissue in Ascidian Embryos Is Induced by FGF9/16/20, Acting via a Combination of Maternal GATA and Ets Transcription Factors,” *Cell*, vol. 115, no. 5, pp. 615–627, Nov. 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00928-0.
- [46] G. A. Jindal and E. K. Farley, “Enhancer grammar in development, evolution, and disease: dependencies and interplay,” *Dev Cell*, vol. 56, no. 5, pp. 575–587, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.DEVCEL.2021.02.016.
- [47] D. E. Clyde, M. S. G. Corado, X. Wu, A. Paré, D. Papatsenko, and S. Small, “A self-organizing system of repressor gradients establishes segmental complexity in *Drosophila*,” *Nature* 2004 426:6968, vol. 426, no. 6968, pp. 849–853, Dec. 2003, doi: 10.1038/nature02189.
- [48] G. P. Wagner and V. J. Lynch, “The gene regulatory logic of transcription factor evolution,” *Trends Ecol Evol*, vol. 23, no. 7, pp. 377–385, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.TREE.2008.03.006.

- [49] M. Kaucka, “Cis-regulatory landscapes in the evolution and development of the mammalian skull,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 378, no. 1880, Jul. 2023, doi: 10.1098/RSTB.2022.0079.
- [50] L. A. Lettice, A. E. Hill, P. S. Devenney, and R. E. Hill, “Point mutations in a distant sonic hedgehog cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly,” *Hum Mol Genet*, vol. 17, no. 7, pp. 978–985, Apr. 2008, doi: 10.1093/HMG/DDM370.
- [51] L. Goea *et al.*, “Hnf1b renal expression directed by a distal enhancer responsive to Pax8,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41598-022-21171-X.
- [52] G. Zhang *et al.*, “DiseaseEnhancer: a resource of human disease-associated enhancer catalog,” *Nucleic Acids Res*, vol. 46, no. Database issue, p. D78, Jan. 2018, doi: 10.1093/NAR/GKX920.
- [53] J. M. Karnuta and P. C. Scacheri, “Enhancers: bridging the gap between gene control and human disease,” *Hum Mol Genet*, vol. 27, no. R2, p. R219, Aug. 2018, doi: 10.1093/HMG/DDY167.
- [54] J. B. Zaugg *et al.*, “Current challenges in understanding the role of enhancers in disease,” *Nature Structural & Molecular Biology* 2022 29:12, vol. 29, no. 12, pp. 1148–1158, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41594-022-00896-3.
- [55] E. S. Wong *et al.*, “Deep conservation of the enhancer regulatory code in animals,” *Science* (1979), vol. 370, no. 6517, Nov. 2020, doi: 10.1126/SCIENCE.AAX8137/SUPPL_FILE/AAX8137_WONG_SM.PDF.
- [56] E. S. Wong, D. Thybert, B. M. Schmitt, K. Stefflova, D. T. Odom, and P. Flicek, “Decoupling of evolutionary changes in transcription factor binding and gene expression in mammals,” *Genome Res*, vol. 25, no. 2, p. 167, Feb. 2015, doi: 10.1101/GR.177840.114.
- [57] D. Villar *et al.*, “Enhancer Evolution across 20 Mammalian Species,” *Cell*, vol. 160, no. 3, p. 554, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.01.006.
- [58] D. E. Dickel *et al.*, “Ultraconserved Enhancers Are Required for Normal Development,” *Cell*, vol. 172, no. 3, pp. 491–499.e15, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2017.12.017.
- [59] S. E. Romanov, D. A. Kalashnikova, and P. P. Laktionov, “Methods of massive parallel reporter assays for investigation of enhancers,” *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, vol. 25, no. 3, p. 344, 2021, doi: 10.18699/VJ21.038.
- [60] Roadmap Epigenomics Consortium *et al.*, “Integrative analysis of 111 reference human epigenomes,” *Nature* 2015 518:7539, vol. 518, no. 7539, pp. 317–330, Feb. 2015, doi: 10.1038/nature14248.
- [61] J. Ernst *et al.*, “Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types,” *Nature* 2011 473:7345, vol. 473, no. 7345, pp. 43–49, Mar. 2011, doi: 10.1038/nature09906.

- [62] K. Cheung, M. J. Barter, J. Falk, C. J. Proctor, L. N. Reynard, and D. A. Young, "Histone ChIP-Seq identifies differential enhancer usage during chondrogenesis as critical for defining cell-type specificity," *The FASEB Journal*, vol. 34, no. 4, p. 5317, Apr. 2020, doi: 10.1096/FJ.201902061RR.
- [63] R. Nakato and T. Sakata, "Methods for ChIP-seq analysis: A practical workflow and advanced applications," *Methods*, vol. 187, pp. 44–53, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.YMETH.2020.03.005.
- [64] J. D. Buenrostro, B. Wu, H. Y. Chang, and W. J. Greenleaf, "ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide," *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, vol. 109, p. 21.29.1, 2015, doi: 10.1002/0471142727.MB2129S109.
- [65] F. Yan, D. R. Powell, D. J. Curtis, and N. C. Wong, "From reads to insight: a hitchhiker's guide to ATAC-seq data analysis," *Genome Biology* 2020 21:1, vol. 21, no. 1, pp. 1–16, Feb. 2020, doi: 10.1186/S13059-020-1929-3.
- [66] C. Liu *et al.*, "An ATAC-seq atlas of chromatin accessibility in mouse tissues," *Scientific Data* 2019 6:1, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, May 2019, doi: 10.1038/s41597-019-0071-0.
- [67] J. F. Fullard *et al.*, "An atlas of chromatin accessibility in the adult human brain," *Genome Res*, vol. 28, no. 8, pp. 1243–1252, Aug. 2018, doi: 10.1101/GR.232488.117/-/DC1.
- [68] X. Wei *et al.*, "An ATAC-seq Dataset Uncovers the Regulatory Landscape During Axolotl Limb Regeneration," *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 651145, Mar. 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.651145/BIBTEX.
- [69] A. N. Schep, J. D. Buenrostro, S. K. Denny, K. Schwartz, G. Sherlock, and W. J. Greenleaf, "Structured nucleosome fingerprints enable high-resolution mapping of chromatin architecture within regulatory regions," *Genome Res*, vol. 25, no. 11, p. 1757, Nov. 2015, doi: 10.1101/GR.192294.115.
- [70] M. Ding, W. Huang, G. Liu, B. Zhai, H. Yan, and Y. Zhang, "Integration of ATAC-Seq and RNA-Seq reveals FOSL2 drives human liver progenitor-like cell aging by regulating inflammatory factors," *BMC Genomics*, vol. 24, no. 1, pp. 1–17, Dec. 2023, doi: 10.1186/S12864-023-09349-7/FIGURES/6.
- [71] A. M. Ackermann, Z. Wang, J. Schug, A. Naji, and K. H. Kaestner, "Integration of ATAC-seq and RNA-seq identifies human alpha cell and beta cell signature genes," *Mol Metab*, vol. 5, no. 3, pp. 233–244, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.MOLMET.2016.01.002.
- [72] T. Zhang, Z. Zhang, Q. Dong, J. Xiong, and B. Zhu, "Histone H3K27 acetylation is dispensable for enhancer activity in mouse embryonic stem cells," *Genome Biol*, vol. 21, no. 1, pp. 1–7, Feb. 2020, doi: 10.1186/S13059-020-01957-W/FIGURES/2.
- [73] E. M. Tanaka and P. W. Reddien, "The cellular basis for animal regeneration," *Dev Cell*, vol. 21, no. 1, p. 172, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.DEVCEL.2011.06.016.

- [74] C.-H. Chen and K. D. Poss, "Regeneration Genetics," 2017, doi: 10.1146/annurev-genet-120116.
- [75] A. Tata *et al.*, "Myoepithelial Cells of Submucosal Glands Can Function as Reserve Stem Cells to Regenerate Airways after Injury," *Cell Stem Cell*, vol. 22, pp. 668–683, 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.03.018.
- [76] A. W. Seifert and K. Muneoka, "The blastema and epimorphic regeneration in mammals," *Dev Biol*, vol. 433, no. 2, p. 190, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.YDBIO.2017.08.007.
- [77] N. Rao *et al.*, "Proteomic analysis of blastema formation in regenerating axolotl limbs," *BMC Biol*, vol. 7, p. 83, Nov. 2009, doi: 10.1186/1741-7007-7-83.
- [78] T. Polvadore and M. Maden, "Retinoic Acid Receptors and the Control of Positional Information in the Regenerating Axolotl Limb," *Cells 2021, Vol. 10, Page 2174*, vol. 10, no. 9, p. 2174, Aug. 2021, doi: 10.3390/CELLS10092174.
- [79] M. Suzuki, A. Satoh, H. Ide, and K. Tamura, "Nerve-dependent and -independent events in blastema formation during *Xenopus* froglet limb regeneration," *Dev Biol*, vol. 286, no. 1, pp. 361–375, Oct. 2005, doi: 10.1016/J.YDBIO.2005.08.021.
- [80] S. Min and J. L. Whited, "Limb blastema formation: How much do we know at a genetic and epigenetic level?," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 299, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.1016/J.JBC.2022.102858.
- [81] A. M. Rodriguez and J. Kang, "Regeneration enhancers: Starting a journey to unravel regulatory events in tissue regeneration," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 97, pp. 47–54, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2019.04.003.
- [82] F. Knopf *et al.*, "Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin," *Dev Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 713–724, May 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2011.04.014.
- [83] M. A. Serowoky, S. T. Kuwahara, S. Liu, V. Vakhshori, J. R. Lieberman, and F. V. Mariani, "A murine model of large-scale bone regeneration reveals a selective requirement for Sonic Hedgehog," *npj Regenerative Medicine 2022 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–19, May 2022, doi: 10.1038/s41536-022-00225-8.
- [84] J. L. Kopp, M. Grompe, and M. Sander, "Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration," *Nat Cell Biol*, vol. 18, no. 3, pp. 238–245, Feb. 2016, doi: 10.1038/NCB3309.
- [85] F. Cervantes-Diaz, P. Contreras, and S. Marcellini, "Evolutionary origin of endochondral ossification: the transdifferentiation hypothesis," *Dev Genes Evol*, vol. 227, no. 2, pp. 121–127, Mar. 2017, doi: 10.1007/S00427-016-0567-Y.
- [86] Y. Xiong *et al.*, "The role of the immune microenvironment in bone, cartilage, and soft tissue regeneration: from mechanism to therapeutic opportunity," *Military Medical Research 2022 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–29, Nov. 2022, doi: 10.1186/S40779-022-00426-8.
- [87] H. Kono, A. Onda, and T. Yanagida, "Molecular determinants of sterile inflammation," *Curr Opin Immunol*, vol. 26, no. 1, pp. 147–156, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.COI.2013.12.004.

- [88] Z. Julier, A. J. Park, P. S. Briquez, and M. M. Martino, "Promoting tissue regeneration by modulating the immune system," *Acta Biomater*, vol. 53, pp. 13–28, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2017.01.056.
- [89] S. Reinke *et al.*, "Terminally differentiated CD8⁺ T cells negatively affect bone regeneration in humans," *Sci Transl Med*, vol. 5, no. 177, Mar. 2013, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.3004754.
- [90] H. Lei, K. Schmidt-Bleek, A. Dienelt, P. Reinke, and H. D. Volk, "Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners," *Front Pharmacol*, vol. 6, no. SEP, 2015, doi: 10.3389/FPHAR.2015.00184.
- [91] P. Abnave and E. Ghigo, "Role of the immune system in regeneration and its dynamic interplay 1 with adult stem cells. 2 3," 2018, Accessed: Jan. 16, 2024. [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>
- [92] N. Kyritsis *et al.*, "Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain," *Science (1979)*, vol. 338, no. 6112, pp. 1353–1356, Dec. 2012, doi: 10.1126/SCIENCE.1228773/SUPPL_FILE/KYRITSIS.SM.PDF.
- [93] J. W. Godwin, A. R. Pinto, and N. A. Rosenthal, "Macrophages are required for adult salamander limb regeneration," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 23, pp. 9415–9420, Jun. 2013, doi: 10.1073/PNAS.1300290110/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [94] J. M. Vieira *et al.*, "BRG1-SWI/SNF-dependent regulation of the Wt1 transcriptional landscape mediates epicardial activity during heart development and disease," *Nature Communications 2017 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Jul. 2017, doi: 10.1038/ncomms16034.
- [95] K. D. Poss, "Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals," *Nature Reviews Genetics 2010 11:10*, vol. 11, no. 10, pp. 710–722, Sep. 2010, doi: 10.1038/nrg2879.
- [96] N. Suzuki and H. Ochi, "Regeneration enhancers: A clue to reactivation of developmental genes," *Dev Growth Differ*, vol. 62, no. 5, p. 343, Jun. 2020, doi: 10.1111/DGD.12654.
- [97] J. Kang *et al.*, "Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements," *Nature*, vol. 532, no. 7598, p. 201, Apr. 2016, doi: 10.1038/NATURE17644.
- [98] C. A. Guenther *et al.*, "A distinct regulatory region of the Bmp5 locus activates gene expression following adult bone fracture or soft tissue injury," *Bone*, vol. 77, p. 31, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.BONE.2015.04.010.
- [99] S. Naik *et al.*, "Inflammatory memory sensitizes skin epithelial stem cells to tissue damage," *Nature 2017 550:7677*, vol. 550, no. 7677, pp. 475–480, Oct. 2017, doi: 10.1038/nature24271.
- [100] R. Tada *et al.*, "The shh limb enhancer is activated in patterned limb regeneration but not in hypomorphic limb regeneration in *Xenopus laevis*," *Dev Biol*, vol. 500, pp. 22–30, Aug. 2023, doi: 10.1016/J.YDBIO.2023.05.009.

- [101] M. Suzuki, A. Satoh, H. Ide, and K. Tamura, "Transgenic *Xenopus* with *prx1* limb enhancer reveals crucial contribution of MEK/ERK and PI3K/AKT pathways in blastema formation during limb regeneration," *Dev Biol*, vol. 304, no. 2, pp. 675–686, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.YDBIO.2007.01.019.
- [102] N. Suzuki, K. Hirano, H. Ogino, and H. Ochi, "Arid3a regulates nephric tubule regeneration via evolutionarily conserved regeneration signal-response enhancers," *Elife*, vol. 8, 2019, doi: 10.7554/ELIFE.43186.
- [103] J. D. Thompson *et al.*, "Identification and requirements of enhancers that direct gene expression during zebrafish fin regeneration," *Development (Cambridge)*, vol. 147, no. 14, Jul. 2020, doi: 10.1242/DEV.191262/266977/AM/IDENTIFICATION-AND-REQUIREMENTS-OF-ENHANCERS-THAT.
- [104] R. Yan *et al.*, "An enhancer-based gene-therapy strategy for spatiotemporal control of cargoes during tissue repair," *Cell Stem Cell*, vol. 30, no. 1, pp. 96–111.e6, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.STEM.2022.11.012.
- [105] A. D. Berendsen and B. R. Olsen, "Bone development," *Bone*, vol. 80, p. 14, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.BONE.2015.04.035.
- [106] S. Chande and C. Bergwitz, "Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism," *Nature Reviews Endocrinology* 2018 14:11, vol. 14, no. 11, pp. 637–655, Sep. 2018, doi: 10.1038/s41574-018-0076-3.
- [107] S. R. Stock, "The Mineral-Collagen Interface in Bone," *Calcif Tissue Int*, vol. 97, no. 3, pp. 262–280, Sep. 2015, doi: 10.1007/S00223-015-9984-6.
- [108] A. Salhotra, H. N. Shah, B. Levi, and M. T. Longaker, "Mechanisms of bone development and repair," *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:11, vol. 21, no. 11, pp. 696–711, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41580-020-00279-w.
- [109] S. E. Youtlen *et al.*, "Osteocyte transcriptome mapping identifies a molecular landscape controlling skeletal homeostasis and susceptibility to skeletal disease," *Nature Communications* 2021 12:1, vol. 12, no. 1, pp. 1–21, May 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22517-1.
- [110] A. Fritz, A. Bertin, P. Hanna, F. Nualart, and S. Marcellini, "A Single Chance to Contact Multiple Targets: Distinct Osteocyte Morphotypes Shed Light on the Cellular Mechanism Ensuring the Robust Formation of Osteocytic Networks," *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, vol. 326, no. 5, pp. 280–289, Jul. 2016, doi: 10.1002/JEZ.B.22683.
- [111] F. Long and D. M. Ornitz, "Development of the endochondral skeleton," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 5, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A008334.
- [112] V. Lefebvre and P. Bhattaram, "Vertebrate skeletogenesis," *Curr Top Dev Biol*, vol. 90, no. C, p. 291, 2010, doi: 10.1016/S0070-2153(10)90008-2.

- [113] Q. Liu, M. Li, S. Wang, Z. Xiao, Y. Xiong, and G. Wang, "Recent Advances of Osterix Transcription Factor in Osteoblast Differentiation and Bone Formation," *Front Cell Dev Biol*, vol. 8, p. 601224, Dec. 2020, doi: 10.3389/FCELL.2020.601224/BIBTEX.
- [114] T. A. Yorgan, S. Peters, M. Amling, and T. Schinke, "Osteoblast-specific expression of Panx3 is dispensable for postnatal bone remodeling," *Bone*, vol. 127, pp. 155–163, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.BONE.2019.06.008.
- [115] G. Holmes, T. G. Bromage, and C. Basilico, "The Sox2 high mobility group transcription factor inhibits mature osteoblast function in transgenic mice," *Bone*, vol. 49, no. 4, p. 653, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.BONE.2011.06.008.
- [116] T. Komori, "Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2," *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 1694*, vol. 20, no. 7, p. 1694, Apr. 2019, doi: 10.3390/IJMS20071694.
- [117] X. Qin *et al.*, "Runx2 is essential for the transdifferentiation of chondrocytes into osteoblasts," *PLoS Genet*, vol. 16, no. 11, Nov. 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1009169.
- [118] T. Komori *et al.*, "Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts," *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 755–764, May 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80258-5.
- [119] G. Levi, N. Narboux-Nême, and M. Cohen-Solal, "DLX Genes in the Development and Maintenance of the Vertebrate Skeleton: Implications for Human Pathologies," *Cells 2022, Vol. 11, Page 3277*, vol. 11, no. 20, p. 3277, Oct. 2022, doi: 10.3390/CELLS11203277.
- [120] T. Kawane *et al.*, "Dlx5 and mef2 regulate a novel runx2 enhancer for osteoblast-specific expression," *J Bone Miner Res*, vol. 29, no. 9, pp. 1960–1969, 2014, doi: 10.1002/JBMR.2240.
- [121] N. M. Collette *et al.*, "Targeted deletion of Sost distal enhancer increases bone formation and bone mass," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 35, pp. 14092–14097, Aug. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1207188109/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [122] H. Wu *et al.*, "Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis," *Genome Biol*, vol. 15, no. 3, pp. 1–17, Mar. 2014, doi: 10.1186/GB-2014-15-3-R52/FIGURES/6.
- [123] H. Hojo, S. Ohba, X. He, L. P. Lai, and A. P. McMahon, "Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification," *Dev Cell*, vol. 37, no. 3, pp. 238–253, May 2016, doi: 10.1016/J.DEVCEL.2016.04.002.
- [124] G. Sapkota, C. Alarcón, F. M. Spagnoli, A. H. Brivanlou, and J. Massagué, "Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker," *Mol Cell*, vol. 25, no. 3, pp. 441–454, Feb. 2007, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.01.006.
- [125] S. Yu *et al.*, "BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals Klf4 as a novel transcription factor of osteoblast differentiation," *Cell Death & Disease 2021 12:2*, vol. 12, no. 2, pp. 1–17, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03480-7.

- [126] D. O. Wagner and P. Aspenberg, "Where did bone come from?: An overview of its evolution," *Acta Orthop*, vol. 82, no. 4, p. 393, Aug. 2011, doi: 10.3109/17453674.2011.588861.
- [127] J. N. Keating, C. L. Marquart, F. Marone, and P. C. J. Donoghue, "The nature of aspidin and the evolutionary origin of bone," *Nature Ecology & Evolution 2018 2:9*, vol. 2, no. 9, pp. 1501–1506, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41559-018-0624-1.
- [128] O. J. Atake and B. F. Eames, "Mineralized Cartilage and Bone-Like Tissues in Chondrichthyans Offer Potential Insights Into the Evolution and Development of Mineralized Tissues in the Vertebrate Endoskeleton," *Front Genet*, vol. 12, p. 762042, Dec. 2021, doi: 10.3389/FGENE.2021.762042/BIBTEX.
- [129] N. B. Fröbisch, C. Bickelmann, and F. Witzmann, "Early evolution of limb regeneration in tetrapods: evidence from a 300-million-year-old amphibian," *Proc Biol Sci*, vol. 281, no. 1794, Sep. 2014, doi: 10.1098/RSPB.2014.1550.
- [130] R. Cuervo, R. Hernández-Martínez, J. Chimal-Monroy, H. Merchant-Larios, and L. Covarrubias, "Full regeneration of the tribasal *Polypterus* fin," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 10, pp. 3838–3843, Mar. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1006619109/SUPPL_FILE/PNAS.201006619SI.PDF.
- [131] T. Uemoto, G. Abe, and K. Tamura, "Regrowth of zebrafish caudal fin regeneration is determined by the amputated length," *Scientific Reports 2020 10:1*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-57533-6.
- [132] L. S. Phipps, L. Marshall, K. Dorey, and E. Amaya, "Model systems for regeneration: *Xenopus*," *Development (Cambridge)*, vol. 147, no. 6, Mar. 2020, doi: 10.1242/DEV.180844/223048.
- [133] A. M. Lovely, T. J. Duerr, Q. Qiu, S. Galvan, S. R. Voss, and J. R. Monaghan, "Wnt Signaling Coordinates the Expression of Limb Patterning Genes During *Axolotl* Forelimb Development and Regeneration," *Front Cell Dev Biol*, vol. 10, p. 814250, Apr. 2022, doi: 10.3389/FCELL.2022.814250/BIBTEX.
- [134] L. A. Sensiate and H. Marques-Souza, "Bone growth as the main determinant of mouse digit tip regeneration after amputation," *Scientific Reports 2019 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–8, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-45521-4.
- [135] G. Battafarano *et al.*, "Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering," *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 1128*, vol. 22, no. 3, p. 1128, Jan. 2021, doi: 10.3390/IJMS22031128.
- [136] Y. Yahara, T. Nguyen, K. Ishikawa, K. Kamei, and B. A. Alman, "The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair," *Development (Cambridge)*, vol. 149, no. 8, Apr. 2022, doi: 10.1242/DEV.199908/275249.

- [137] C. Khoswanto, "Role of matrix metalloproteinases in bone regeneration: Narrative review," *J Oral Biol Craniofac Res*, vol. 13, no. 5, p. 539, Sep. 2023, doi: 10.1016/J.JOBCR.2023.06.002.
- [138] L. Feng *et al.*, "Xenopus Laevis as a Novel Model to Study Long Bone Critical-Size Defect Repair by Growth Factor-Mediated Regeneration," <https://home.liebertpub.com/tea>, vol. 17, no. 5–6, pp. 691–701, Dec. 2010, doi: 10.1089/TEN.TEA.2010.0123.
- [139] C. Hutchison, M. Pilote, and S. Roy, "The axolotl limb: A model for bone development, regeneration and fracture healing," *Bone*, vol. 40, no. 1, pp. 45–56, Jan. 2007, doi: 10.1016/J.BONE.2006.07.005.
- [140] A. Polikarpova *et al.*, "The specialist in regeneration—the Axolotl—a suitable model to study bone healing?," *npj Regenerative Medicine* 2022 7:1, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41536-022-00229-4.
- [141] L. Batoon, S. M. Millard, L. J. Raggatt, and A. R. Pettit, "Osteomacs and Bone Regeneration," *Curr Osteoporos Rep*, vol. 15, no. 4, pp. 385–395, Aug. 2017, doi: 10.1007/S11914-017-0384-X/FIGURES/2.
- [142] M. Kang *et al.*, "Bone Regeneration is Mediated by Macrophage Extracellular Vesicles," *Bone*, vol. 141, p. 115627, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.BONE.2020.115627.
- [143] M. Ansari, "Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies," *Prog Biomater*, vol. 8, no. 4, pp. 223–237, Dec. 2019, doi: 10.1007/S40204-019-00125-Z/FIGURES/5.
- [144] R. M. Samsonraj, A. Dudakovic, P. Zan, O. Pichurin, S. M. Cool, and A. J. Van Wijnen, "A Versatile Protocol for Studying Calvarial Bone Defect Healing in a Mouse Model," *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 23, no. 11, p. 686, Nov. 2017, doi: 10.1089/TEN.TEC.2017.0205.
- [145] G. Lu *et al.*, "An instantly fixable and self-adaptive scaffold for skull regeneration by autologous stem cell recruitment and angiogenesis," *Nature Communications* 2022 13:1, vol. 13, no. 1, pp. 1–20, May 2022, doi: 10.1038/s41467-022-30243-5.
- [146] Z. A. Aldawood *et al.*, "Expansion of the sagittal suture induces proliferation of skeletal stem cells and sustains endogenous calvarial bone regeneration," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 120, no. 16, p. e2120826120, Apr. 2023, doi: 10.1073/PNAS.2120826120/SUPPL_FILE/PNAS.2120826120.SAPP.PDF.
- [147] K. Wilk *et al.*, "Postnatal Calvarial Skeletal Stem Cells Expressing PRX1 Reside Exclusively in the Calvarial Sutures and Are Required for Bone Regeneration," *Stem Cell Reports*, vol. 8, no. 4, pp. 933–946, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.STEMCR.2017.03.002.
- [148] K. Geurtzen, F. Knopf, D. Wehner, L. F. A. Huitema, S. Schulte-Merker, and G. Weidinger, "Mature osteoblasts dedifferentiate in response to traumatic bone injury in the zebrafish fin and skull," *Development*, vol. 141, no. 11, pp. 2225–2234, Jun. 2014, doi: 10.1242/DEV.105817.

- [149] D. Muñoz, H. Castillo, J. P. Henríquez, and S. Marcellini, “Bone regeneration after traumatic skull injury in *Xenopus tropicalis*,” *Mech Dev*, vol. 154, pp. 153–161, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.MOD.2018.06.007.
- [150] U. Hellsten *et al.*, “The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*,” *Science*, vol. 328, no. 5978, pp. 633–636, Apr. 2010, doi: 10.1126/SCIENCE.1183670.
- [151] K. Suda, S. R. Hayashi, K. Tamura, N. Takamatsu, and M. Ito, “Activation of DNA Transposons and Evolution of piRNA Genes Through Interspecific Hybridization in *Xenopus* Frogs,” *Front Genet*, vol. 13, p. 766424, Jan. 2022, doi: 10.3389/FGENE.2022.766424/BIBTEX.
- [152] P. D. Nieuwkoop and J. Faber, “Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin).” North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1967.
- [153] B. J. Slater, K. J. Liu, M. D. Kwan, N. Quarto, and M. T. Longaker, “Cranial Osteogenesis and Suture Morphology in *Xenopus laevis*: A Unique Model System for Studying Craniofacial Development,” *PLoS One*, vol. 4, no. 1, Jan. 2009, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0003914.
- [154] E. M. MacKenzie, J. B. Atkins, D. E. Korneisel, A. S. Cantelon, I. W. McKinnell, and H. C. Maddin, “Normal development in *Xenopus laevis*: A complementary staging table for the skull based on cartilage and bone,” *Developmental Dynamics*, vol. 251, no. 8, pp. 1340–1356, Aug. 2022, doi: 10.1002/DVDY.465.
- [155] A. R. Bright *et al.*, “Combinatorial transcription factor activities on open chromatin induce embryonic heterogeneity in vertebrates,” *EMBO J*, vol. 40, no. 9, May 2021, doi: 10.15252/EMBJ.2020104913.
- [156] C. Jansen *et al.*, “Uncovering the mesendoderm gene regulatory network through multi-omic data integration,” *Cell Rep*, vol. 38, no. 7, p. 110364, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.CELREP.2022.110364.
- [157] Z. Shi *et al.*, “Activation of P53 pathway contributes to *Xenopus* hybrid inviability,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 120, no. 21, 2023, doi: 10.1073/PNAS.2303698120/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [158] A. D. Kakebeen, A. D. Chitsazan, M. C. Williams, L. M. Saunders, and A. E. Wills, “Chromatin accessibility dynamics and single cell RNA-seq reveal new regulators of regeneration in neural progenitors,” *Elife*, vol. 9, Apr. 2020, doi: 10.7554/ELIFE.52648.
- [159] C. Ramlochansingh, F. Branoner, B. P. Chagnaud, and H. Straka, “Efficacy of Tricaine Methanesulfonate (MS-222) as an Anesthetic Agent for Blocking Sensory-Motor Responses in *Xenopus laevis* Tadpoles,” *PLoS One*, vol. 9, no. 7, p. e101606, Jul. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0101606.
- [160] A. Bertin, P. Hanna, G. Otarola, A. Fritz, J. P. Henriquez, and S. Marcellini, “Cellular and molecular characterization of a novel primary osteoblast culture from the vertebrate model organism *Xenopus tropicalis*,” *Histochem Cell Biol*, vol. 143, no. 4, pp. 431–442, Mar. 2015, doi: 10.1007/S00418-014-1289-8.

- [161] J. D. Buenrostro, B. Wu, H. Y. Chang, and W. J. Greenleaf, "ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide," *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, vol. 109, p. 21.29.1, 2015, doi: 10.1002/0471142727.MB2129S109.
- [162] M. Martin, "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads," *EMBnet J*, vol. 17, no. 1, pp. 10–12, May 2011, Accessed: Dec. 21, 2023. [Online]. Available: <https://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200/479>
- [163] B. Langmead and S. L. Salzberg, "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2," *Nat Methods*, vol. 9, no. 4, p. 357, Apr. 2012, doi: 10.1038/NMETH.1923.
- [164] P. Danecek *et al.*, "Twelve years of SAMtools and BCFtools," *Gigascience*, vol. 10, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.1093/GIGASCIENCE/GIAB008.
- [165] H. Li *et al.*, "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 16, p. 2078, Aug. 2009, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTP352.
- [166] A. R. Quinlan and I. M. Hall, "BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 6, p. 841, Mar. 2010, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ033.
- [167] M. D. Robinson and A. Oshlack, "A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data," *Genome Biol*, vol. 11, no. 3, pp. 1–9, Mar. 2010, doi: 10.1186/GB-2010-11-3-R25/FIGURES/3.
- [168] F. Ramírez, F. Dündar, S. Diehl, B. A. Grüning, and T. Manke, "deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data," *Nucleic Acids Res*, vol. 42, no. Web Server issue, Jul. 2014, doi: 10.1093/NAR/GKU365.
- [169] J. Schug, W. P. Schuller, C. Kappen, J. M. Salbaum, M. Bucan, and C. J. Stoeckert, "Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy," *Genome Biol*, vol. 6, no. 4, p. R33, 2005, doi: 10.1186/GB-2005-6-4-R33.
- [170] Y. Shen *et al.*, "A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome," *Nature*, vol. 488, no. 7409, p. 116, Aug. 2012, doi: 10.1038/NATURE11243.
- [171] S. Heinz *et al.*, "Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities," *Mol Cell*, vol. 38, no. 4, p. 576, May 2010, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.05.004.
- [172] A. Alexa, J. Rahnenführer, and T. Lengauer, "Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure," *Bioinformatics*, vol. 22, no. 13, pp. 1600–1607, Jul. 2006, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTL140.
- [173] Y. Tanigawa, E. S. Dyer, and G. Bejerano, "WhichTF is functionally important in your open chromatin data?," *PLoS Comput Biol*, vol. 18, no. 8, p. e1010378, Aug. 2022, doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1010378.

- [174] C. Y. McLean *et al.*, "GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions," *Nat Biotechnol*, vol. 28, no. 5, p. 495, May 2010, doi: 10.1038/NBT.1630.
- [175] D. Kim, B. Langmead, and S. L. Salzberg, "HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements," *Nat Methods*, vol. 12, no. 4, p. 357, Mar. 2015, doi: 10.1038/NMETH.3317.
- [176] M. Smid *et al.*, "Gene length corrected trimmed mean of M-values (GeTMM) processing of RNA-seq data performs similarly in intersample analyses while improving intrasample comparisons," *BMC Bioinformatics*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2018, doi: 10.1186/S12859-018-2246-7/TABLES/2.
- [177] L. Kumar and M. E. Futschik, "Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data," *Bioinformation*, vol. 2, no. 1, pp. 5–7, May 2007, doi: 10.6026/97320630002005.
- [178] Z. Saidak *et al.*, "Wnt/ β -catenin signaling mediates osteoblast differentiation triggered by peptide-induced $\alpha 5\beta 1$ integrin priming in mesenchymal skeletal cells," *J Biol Chem*, vol. 290, no. 11, pp. 6903–6912, Mar. 2015, doi: 10.1074/JBC.M114.621219.
- [179] S. Zhou, "TGF- β regulates β -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells," *J Cell Biochem*, vol. 112, no. 6, pp. 1651–1660, Jun. 2011, doi: 10.1002/JCB.23079.
- [180] T. Matsunobu *et al.*, "Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development," *Dev Biol*, vol. 332, no. 2, pp. 325–338, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.YDBIO.2009.06.002.
- [181] Y. Imai, K. Ishida, M. Nemoto, K. Nakata, T. Kato, and M. Maéno, "Multiple origins of embryonic and tadpole myeloid cells in *Xenopus laevis*," *Cell Tissue Res*, vol. 369, no. 2, pp. 341–352, Aug. 2017, doi: 10.1007/S00441-017-2601-4.
- [182] P. Liu *et al.*, "Specific ablation of mouse Fam20C in cells expressing type I collagen leads to skeletal defects and hypophosphatemia," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Jun. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-03960-x.
- [183] M. Ishikawa *et al.*, "Pannexin 3 ER Ca²⁺ channel gating is regulated by phosphorylation at the Serine 68 residue in osteoblast differentiation," *Scientific Reports 2019 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55371-9.
- [184] N. Leurs, C. Martinand-Mari, S. Marcellini, and M. Debais-Thibaud, "Parallel Evolution of Ameloblastic scpp Genes in Bony and Cartilaginous Vertebrates," *Mol Biol Evol*, vol. 39, no. 5, May 2022, doi: 10.1093/MOLBEV/MSAC099.
- [185] S. Bertrand *et al.*, "A dynamic history of gene duplications and losses characterizes the evolution of the SPARC family in eumetazoans," *Proc Biol Sci*, vol. 280, no. 1757, 2013, doi: 10.1098/RSPB.2012.2963.
- [186] E. Ayoub *et al.*, "EVI1 overexpression reprograms hematopoiesis via upregulation of Spi1 transcription," *Nature Communications 2018 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Oct. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06208-y.

- [187] E. C. Liao *et al.*, “Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid beta-spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability,” *Development*, vol. 127, no. 23, pp. 5123–5132, 2000, doi: 10.1242/DEV.127.23.5123.
- [188] E. Sutus, S. Henry, L. Adorján, G. Kovács, and M. K. Pirity, “RYBP regulates Pax6 during in vitro neural differentiation of mouse embryonic stem cells,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41598-022-06228-1.
- [189] R. Steinhaus, T. Gonzalez, D. Seelow, and P. N. Robinson, “Pervasive and CpG-dependent promoter-like characteristics of transcribed enhancers,” *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 10, pp. 5306–5317, Jun. 2020, doi: 10.1093/NAR/GKAA223.
- [190] M. Rimoldi *et al.*, “DNA methylation patterns of transcription factor binding regions characterize their functional and evolutionary contexts,” *bioRxiv*, p. 2022.07.21.500978, Jul. 2022, doi: 10.1101/2022.07.21.500978.
- [191] A. Curina *et al.*, “High constitutive activity of a broad panel of housekeeping and tissue-specific cis-regulatory elements depends on a subset of ETS proteins,” *Genes Dev*, vol. 31, no. 4, pp. 399–412, Feb. 2017, doi: 10.1101/GAD.293134.116/-/DC1.
- [192] J. Y. Leung and J. R. Nevins, “E2F6 Associates with BRG1 in Transcriptional Regulation,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e47967, Oct. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0047967.
- [193] G. Terrados *et al.*, “Genome-wide localization and expression profiling establish Sp2 as a sequence-specific transcription factor regulating vitally important genes,” *Nucleic Acids Res*, vol. 40, no. 16, pp. 7844–7857, Sep. 2012, doi: 10.1093/NAR/GKS544.
- [194] A. Bozec, L. Bakiri, M. Jimenez, T. Schinke, M. Amling, and E. F. Wagner, “Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production,” *J Cell Biol*, vol. 190, no. 6, pp. 1093–1106, Sep. 2010, doi: 10.1083/JCB.201002111.
- [195] J. Suo *et al.*, “VGLL4 promotes osteoblast differentiation by antagonizing TEADs-inhibited Runx2 transcription,” *Sci Adv*, vol. 6, no. 43, Oct. 2020, doi: 10.1126/SCIADV.ABA4147.
- [196] D. S. Lee *et al.*, “NFI-C regulates osteoblast differentiation via control of osterix expression,” *Stem Cells*, vol. 32, no. 9, pp. 2467–2479, 2014, doi: 10.1002/STEM.1733.
- [197] P. Bialek *et al.*, “A twist code determines the onset of osteoblast differentiation,” *Dev Cell*, vol. 6, no. 3, pp. 423–435, Mar. 2004, doi: 10.1016/S1534-5807(04)00058-9.
- [198] M. M. Winslow *et al.*, “Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass,” *Dev Cell*, vol. 10, no. 6, pp. 771–782, Jun. 2006, doi: 10.1016/J.DEVCEL.2006.04.006.
- [199] P. Hanna, “Control transcripcional óseo y repeticiones genómicas en *Xenopus tropicalis*: un análisis por RNA-seq y ChIP-seq in vivo,” Universidad de Concepción, Concepción, 2014.
- [200] K. M. Noh *et al.*, “Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death,” *Proc Natl Acad Sci U*

S A, vol. 109, no. 16, pp. E962–E971, Apr. 2012, doi:
10.1073/PNAS.1121568109/SUPPL_FILE/PNAS.201121568SI.PDF.

- [201] K. Van Bortle, E. Ramos, N. Takenaka, J. Yang, J. E. Wahj, and V. G. Corces, “Drosophila CTCF tandemly aligns with other insulator proteins at the borders of H3K27me3 domains,” *Genome Res*, vol. 22, no. 11, pp. 2176–2187, Nov. 2012, doi: 10.1101/GR.136788.111.
- [202] G. Wang *et al.*, “MACMIC Reveals A Dual Role of CTCF in Epigenetic Regulation of Cell Identity Genes,” *Genomics Proteomics Bioinformatics*, vol. 19, no. 1, pp. 140–153, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.GPB.2020.10.008.
- [203] A. M. Session *et al.*, “Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*,” *Nature* 2016 538:7625, vol. 538, no. 7625, pp. 336–343, Oct. 2016, doi: 10.1038/nature19840.
- [204] I. Irisarri *et al.*, “Phylotranscriptomic consolidation of the jawed vertebrate timetree,” *Nature Ecology & Evolution* 2017 1:9, vol. 1, no. 9, pp. 1370–1378, Jul. 2017, doi: 10.1038/s41559-017-0240-5.
- [205] B. Venkatesh *et al.*, “Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution,” *Nature* 2014 505:7482, vol. 505, no. 7482, pp. 174–179, Jan. 2014, doi: 10.1038/nature12826.
- [206] P. C. J. Donoghue and I. J. Sansom, “Origin and early evolution of vertebrate skeletonization,” *Microsc Res Tech*, vol. 59, no. 5, pp. 352–372, Dec. 2002, doi: 10.1002/JEMT.10217.
- [207] R. H. Hao *et al.*, “Lineage-specific rearrangement of chromatin loops and epigenomic features during adipocytes and osteoblasts commitment,” *Cell Death Differ*, vol. 29, no. 12, pp. 2503–2518, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41418-022-01035-7.
- [208] P. Smits *et al.*, “The Transcription Factors L-Sox5 and Sox6 Are Essential for Cartilage Formation,” *Dev Cell*, vol. 1, no. 2, pp. 277–290, Aug. 2001, doi: 10.1016/S1534-5807(01)00003-X.
- [209] J. Fabik, V. Psutkova, and O. Machon, “Meis2 controls skeletal formation in the hyoid region,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 10, Sep. 2022, doi: 10.3389/FCCELL.2022.951063.
- [210] I. Matsuo, S. Kuratani, C. Kimura, N. Takeda, and S. Aizawa, “Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head,” 1995.
- [211] C. J. Cain *et al.*, “Loss of Iroquois homeobox transcription factors 3 and 5 in osteoblasts disrupts cranial mineralization,” *Bone Rep*, vol. 5, pp. 86–95, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.BONR.2016.02.005.
- [212] H. Shimizu *et al.*, “Identification of a homozygous frameshift variant in RFLNA in a patient with a typical phenotype of spondylocarpotarsal synostosis syndrome,” *Journal of Human Genetics* 2019 64:5, vol. 64, no. 5, pp. 467–471, Feb. 2019, doi: 10.1038/s10038-019-0581-9.

- [213] J. Groppe *et al.*, “Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin,” *Nature* 2003 420:6916, vol. 420, no. 6916, pp. 636–642, Dec. 2002, doi: 10.1038/nature01245.
- [214] J. Upadhyay, O. M. Farr, and C. S. Mantzoros, “The role of leptin in regulating bone metabolism,” *Metabolism*, vol. 64, no. 1, pp. 105–113, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.METABOL.2014.10.021.
- [215] H. Saito *et al.*, “TG-interacting factor 1 (Tgif1)-deficiency attenuates bone remodeling and blunts the anabolic response to parathyroid hormone,” *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/S41467-019-08778-X.
- [216] A. Bozec, L. Bakiri, M. Jimenez, T. Schinke, M. Amling, and E. F. Wagner, “Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production,” *J Cell Biol*, vol. 190, no. 6, p. 1093, Sep. 2010, doi: 10.1083/JCB.201002111.
- [217] H. Wu, G. Xu, and Y. P. Li, “Atp6v0d2 Is an Essential Component of the Osteoclast-Specific Proton Pump That Mediates Extracellular Acidification in Bone Resorption,” *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 24, no. 5, p. 871, May 2009, doi: 10.1359/JBMR.081239.
- [218] F. Ponte *et al.*, “Mmp13 deletion in mesenchymal cells increases bone mass and may attenuate the cortical bone loss caused by estrogen deficiency,” *Scientific Reports* 2022 12:1, vol. 12, no. 1, pp. 1–14, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-14470-w.
- [219] A. Zakrzewska, C. Cui, O. W. Stockhammer, E. L. Benard, H. P. Spaink, and A. H. Meijer, “Macrophage-specific gene functions in Spi1-directed innate immunity,” *Blood*, vol. 116, no. 3, Jul. 2010, doi: 10.1182/BLOOD-2010-01-262873.
- [220] J. H. Lee, B. Kim, W. J. Jin, H. H. Kim, H. Ha, and Z. H. Lee, “Pathogenic roles of CXCL10 signaling through CXCR3 and TLR4 in macrophages and T cells: Relevance for arthritis,” *Arthritis Res Ther*, vol. 19, no. 1, pp. 1–14, Jul. 2017, doi: 10.1186/S13075-017-1353-6/FIGURES/6.
- [221] N. Alos and B. Ecarot, “Downregulation of osteoblast Phex expression by PTH,” *Bone*, vol. 37, no. 4, pp. 589–598, Oct. 2005, doi: 10.1016/J.BONE.2005.05.006.
- [222] D. Novak, L. Hüser, J. J. Elton, V. Umansky, P. Altevogt, and J. Utikal, “SOX2 in development and cancer biology,” *Semin Cancer Biol*, vol. 67, pp. 74–82, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.08.007.
- [223] M. Lee *et al.*, “SOX2 plays a crucial role in cell proliferation and lineage segregation during porcine pre-implantation embryo development,” *Cell Prolif*, vol. 54, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.1111/CPR.13097.
- [224] M. Li *et al.*, “Downregulation of HNRNPK in human cancer cells inhibits lung metastasis,” *Animal Model Exp Med*, vol. 2, no. 4, p. 291, Dec. 2019, doi: 10.1002/AME2.12090.
- [225] G. Ligresti, A. A. Raslan, J. Hong, N. Caporarello, M. Confalonieri, and S. K. Huang, “Mesenchymal Cells in The Lung: Evolving Concepts and Their Role in Fibrosis,” *Gene*, vol. 859, p. 147142, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.GENE.2022.147142.

- [226] H. Yang, D. Li, and C. Cheng, "Relating gene expression evolution with CpG content changes," *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, Aug. 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-693.
- [227] S. Saxonov, P. Berg, and D. L. Brutlag, "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 5, pp. 1412–1417, Jan. 2006, doi: 10.1073/PNAS.0510310103.
- [228] D. Azazi, J. M. Mudge, D. T. Odom, and P. Flicek, "Functional signatures of evolutionarily young CTCF binding sites," *BMC Biol*, vol. 18, no. 1, Sep. 2020, doi: 10.1186/S12915-020-00863-8.
- [229] A. Rada-Iglesias, R. Bajpai, T. Swigut, S. A. Brugmann, R. A. Flynn, and J. Wysocka, "A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans," *Nature*, vol. 470, no. 7333, pp. 279–285, Feb. 2011, doi: 10.1038/NATURE09692.
- [230] P. Cornejo-Páramo, K. Roper, S. M. Degnan, B. M. Degnan, and E. S. Wong, "Distal regulation, silencers, and a shared combinatorial syntax are hallmarks of animal embryogenesis," *Genome Res*, vol. 32, no. 3, pp. 474–487, Mar. 2022, doi: 10.1101/GR.275864.121/-/DC1.
- [231] B. Pang, J. H. van Weerd, F. L. Hamoen, and M. P. Snyder, "Identification of non-coding silencer elements and their regulation of gene expression," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 24, no. 6, pp. 383–395, Jun. 2023, doi: 10.1038/S41580-022-00549-9.
- [232] N. Doni Jayavelu, A. Jajodia, A. Mishra, and R. D. Hawkins, "Candidate silencer elements for the human and mouse genomes," *Nature Communications 2020 11:1*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, Feb. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14853-5.
- [233] M. M. Halstead *et al.*, "A comparative analysis of chromatin accessibility in cattle, pig, and mouse tissues," *BMC Genomics*, vol. 21, no. 1, Oct. 2020, doi: 10.1186/S12864-020-07078-9.
- [234] N. Kishishita and F. Nagawa, "Evolution of adaptive immunity: implications of a third lymphocyte lineage in lampreys," *Bioessays*, vol. 36, no. 3, pp. 244–250, Mar. 2014, doi: 10.1002/BIES.201300145.
- [235] D. A. Hume, E. Wollscheid-Lengeling, R. Rojo, and C. Pridans, "The evolution of the macrophage-specific enhancer (Fms intronic regulatory element) within the CSF1R locus of vertebrates," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15999-x.
- [236] I. M. L. Somorjai, R. L. Somorjai, J. Garcia-Fernàndez, and H. Escrivaà, "Vertebrate-like regeneration in the invertebrate chordate amphioxus," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 2, pp. 517–522, Jan. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1100045109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201100045SI.PDF.
- [237] K. Tarkkonen, R. Hieta, V. Kytölä, M. Nykter, and R. Kiviranta, "Comparative analysis of osteoblast gene expression profiles and Runx2 genomic occupancy of mouse and human

- osteoblasts in vitro," *Gene*, vol. 626, pp. 119–131, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.GENE.2017.05.028.
- [238] S. Yang *et al.*, "Functionally conserved enhancers with divergent sequences in distant vertebrates," *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, Oct. 2015, doi: 10.1186/S12864-015-2070-7.
- [239] A. Madgwick *et al.*, "Evolution of embryonic cis-regulatory landscapes between divergent Phallusia and Ciona ascidians," *Dev Biol*, vol. 448, no. 2, pp. 71–87, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.YDBIO.2019.01.003.
- [240] E. Camp, P. J. Anderson, A. C. W. Zannettino, and S. Gronthos, "Tyrosine kinase receptor cros- oncogene 1 mediates TWIST-1 regulation of human mesenchymal stem cell lineage commitment," *Bone*, vol. 94, pp. 98–107, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.BONE.2016.09.019.
- [241] R. Ghose, M. Malik, and P. W. Huber, "Restricted specificity of Xenopus TFIIIA for transcription of somatic 5S rRNA genes," *Mol Cell Biol*, vol. 24, no. 6, pp. 2467–2477, Mar. 2004, doi: 10.1128/MCB.24.6.2467-2477.2004.
- [242] N. Bomer *et al.*, "Neo-cartilage engineered from primary chondrocytes is epigenetically similar to autologous cartilage, in contrast to using mesenchymal stem cells," *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 24, no. 8, pp. 1423–1430, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.JOCA.2016.03.009.
- [243] R. Andersson *et al.*, "An atlas of active enhancers across human cell types and tissues," *Nature*, vol. 507, no. 7493, pp. 455–461, 2014, doi: 10.1038/NATURE12787.
- [244] H. Castillo *et al.*, "Xenopus tropicalis osteoblast-specific open chromatin regions reveal promoters and enhancers involved in human skeletal phenotypes and shed light on early vertebrate evolution," *Cells & development*, 2024, doi: 10.1016/J.CDEV.2024.203924.
- [245] M. Abrar *et al.*, "Cis-regulatory control of mammalian Trps1 gene expression," *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, vol. 342, no. 2, pp. 85–100, Mar. 2024, doi: 10.1002/JEZ.B.23246.
- [246] J.-Y. Im, W.-K. Min, C. You, H.-O. Kim, H.-K. Jin, and J. Bae, "Bone regeneration of mouse critical-sized calvarial defects with human mesenchymal stem cells in scaffold," *Lab Anim Res*, vol. 29, no. 4, p. 196, 2013, doi: 10.5625/LAR.2013.29.4.196.
- [247] G. M. Cooper, M. P. Mooney, A. K. Gosain, P. G. Campbell, J. E. Losee, and J. Huard, "Testing the 'critical-size' in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD)," *Plast Reconstr Surg*, vol. 125, no. 6, p. 1685, Jun. 2010, doi: 10.1097/PRS.0B013E3181CB63A3.
- [248] J. Costa-Silva, D. Domingues, and F. M. Lopes, "RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool," *PLoS One*, vol. 12, no. 12, p. e0190152, Dec. 2017, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0190152.
- [249] Y. T. Ho *et al.*, "Chromatin accessibility identifies diversity in mesenchymal stem cells from different tissue origins," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41598-018-36057-0.

- [250] M. Y. Y. Lee, K. H. Kaestner, and M. Li, "Benchmarking algorithms for joint integration of unpaired and paired single-cell RNA-seq and ATAC-seq data," *Genome Biol*, vol. 24, no. 1, pp. 1–33, Dec. 2023, doi: 10.1186/S13059-023-03073-X/FIGURES/8.
- [251] F. Xu, P. Cong, Z. Lu, L. Shi, L. Xiong, and G. Zhao, "Integration of ATAC-Seq and RNA-Seq identifies key genes and pathways involved in the neuroprotection of S-adenosylmethionine against perioperative neurocognitive disorder," *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 21, pp. 1942–1954, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.CSBJ.2023.03.001.
- [252] S. Y. Zhang *et al.*, "Integrating ATAC-seq and RNA-seq to identify differentially expressed genes with chromatin-accessible changes during photosynthetic establishment in *Populus* leaves," *Plant Mol Biol*, vol. 113, no. 1–3, pp. 59–74, Oct. 2023, doi: 10.1007/S11103-023-01375-Z/FIGURES/6.
- [253] J. Wang *et al.*, "Integration of RNA-seq and ATAC-seq identifies muscle-regulated hub genes in cattle," *Front Vet Sci*, vol. 9, Aug. 2022, doi: 10.3389/FVETS.2022.925590/FULL.
- [254] A. Conesa *et al.*, "A survey of best practices for RNA-seq data analysis," *Genome Biology* 2016 17:1, vol. 17, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2016, doi: 10.1186/S13059-016-0881-8.
- [255] M. Ghert, I. W. Y. Mak, R. E. Turcotte, S. Popovic, and G. Singh, "AP-1 as a Regulator of MMP-13 in the Stromal Cell of Giant Cell Tumor of Bone," *Biochem Res Int*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/164197.
- [256] R. Eferl *et al.*, "The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation," *EMBO J*, vol. 23, no. 14, p. 2789, Jul. 2004, doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600282.
- [257] E. D. Jensen, R. Gopalakrishnan, and J. J. Westendorf, "Regulation of Gene Expression in Osteoblasts," *Biofactors*, vol. 36, no. 1, p. 25, 2010, doi: 10.1002/BIOF.72.
- [258] L. R. McCabe *et al.*, "Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation," *Endocrinology*, vol. 137, no. 10, pp. 4398–4408, 1996, doi: 10.1210/ENDO.137.10.8828501.
- [259] H. Li *et al.*, "Expression and function of Dlx genes in the osteoblast lineage," 2008, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.01.001.
- [260] J. Hanken and B. K. Hall, "Variation and timing of the cranial ossification sequence of the oriental fire-bellied toad, *Bombina orientalis* (Amphibia, Discoglossidae)," *J Morphol*, vol. 182, no. 3, pp. 245–255, 1984, doi: 10.1002/JMOR.1051820302.
- [261] D. R. Sobreira *et al.*, "Extensive pleiotropism and allelic heterogeneity mediate metabolic effects of IRX3 and IRX5," *Science (1979)*, vol. 372, no. 6546, pp. 1085–1091, Jun. 2021, doi: 10.1126/SCIENCE.ABF1008/SUPPL_FILE/ABF1008-SOBREIRA-SM.PDF.
- [262] D. C. Wan *et al.*, "Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation," *J Biol Chem*, vol. 282, no. 36, pp. 26450–26459, Sep. 2007, doi: 10.1074/JBC.M703282200.

- [263] D. J. Behonick *et al.*, "Role of Matrix Metalloproteinase 13 in Both Endochondral and Intramembranous Ossification during Skeletal Regeneration," *PLoS One*, vol. 2, no. 11, p. 1150, Nov. 2007, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0001150.
- [264] R. Brosh *et al.*, "Synthetic regulatory genomics uncovers enhancer context dependence at the Sox2 locus," *Mol Cell*, vol. 83, no. 7, pp. 1140-1152.e7, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2023.02.027.
- [265] R. Okamoto, M. Uchikawa, and H. Kondoh, "Sixteen additional enhancers associated with the chicken Sox2 locus outside the central 50-kb region," *Dev Growth Differ*, vol. 57, no. 1, pp. 24–39, Jan. 2015, doi: 10.1111/DGD.12185.
- [266] S. A. Wacker, C. L. McNulty, and A. J. Durston, "The initiation of Hox gene expression in *Xenopus laevis* is controlled by Brachyury and BMP-4," *Dev Biol*, vol. 266, no. 1, pp. 123–137, Feb. 2004, doi: 10.1016/J.YDBIO.2003.10.011.
- [267] Dj. T. Farmer, P. Patel, R. Choi, C. Y. Liu, and J. G. Crump, "A comprehensive series of *Irx* cluster mutants reveals diverse roles in facial cartilage development," *Development (Cambridge)*, vol. 148, no. 18, Aug. 2021, doi: 10.1242/DEV.197244/VIDEO-2.
- [268] M. Matsui and J. Klingensmith, "Multiple tissue-specific requirements for the BMP antagonist Noggin in development of the mammalian craniofacial skeleton," *Dev Biol*, vol. 392, no. 2, pp. 168–181, Aug. 2014, doi: 10.1016/J.YDBIO.2014.06.006.
- [269] Y. Arai and S. H. Lee, "MMP13-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Enhance Bone Tissue Formation in the Presence of Collagen Hydrogel," *Tissue Eng Regen Med*, vol. 20, no. 3, p. 461, Jun. 2023, doi: 10.1007/S13770-023-00535-Y.
- [270] M. E. Abdelgawad *et al.*, "Early reversal cells in adult human bone remodeling: osteoblastic nature, catabolic functions and interactions with osteoclasts," *Histochem Cell Biol*, vol. 145, no. 6, pp. 603–615, Jun. 2016, doi: 10.1007/S00418-016-1414-Y.
- [271] K. B. S. Paiva and J. M. Granjeiro, "Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair," *Prog Mol Biol Transl Sci*, vol. 148, pp. 203–303, Jan. 2017, doi: 10.1016/BS.PMBTS.2017.05.001.
- [272] J. M. Delaisse, T. L. Andersen, H. B. Kristensen, P. R. Jensen, C. M. Andreasen, and K. Sjøe, "Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss," *Bone*, vol. 141, p. 115628, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.BONE.2020.115628.
- [273] R. R. Cevallos, Y. J. K. Edwards, J. M. Parant, B. K. Yoder, and K. Hu, "Human transcription factors responsive to initial reprogramming predominantly undergo legitimate reprogramming during fibroblast conversion to iPSCs," *Scientific Reports 2020 10:1*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-76705-y.
- [274] M. Herreros-Villanueva *et al.*, "SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells," *Oncogenesis 2013 2:8*, vol. 2, no. 8, pp. e61–e61, Aug. 2013, doi: 10.1038/oncsis.2013.23.

- [275] S. Wang *et al.*, "SOX2 Promotes Radioresistance in Non-small Cell Lung Cancer by Regulating Tumor Cells Dedifferentiation," *Int J Med Sci*, vol. 20, no. 6, p. 781, 2023, doi: 10.7150/IJMS.75315.
- [276] B. Lin *et al.*, "Injury induces endogenous reprogramming and dedifferentiation of neuronal progenitors to multipotency," *Cell Stem Cell*, vol. 21, no. 6, p. 761, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.STEM.2017.09.008.
- [277] Q. Wan, T. Schoenmaker, I. D. C. Jansen, Z. Bian, T. J. de Vries, and V. Everts, "Osteoblasts of calvaria induce higher numbers of osteoclasts than osteoblasts from long bone," *Bone*, vol. 86, pp. 10–21, May 2016, doi: 10.1016/J.BONE.2016.02.010.
- [278] K. Momeni, S. Ghorbian, E. Ahmadpour, and R. Sharifi, "Unraveling the complexity: understanding the deconvolutions of RNA-seq data," *Translational Medicine Communications 2023 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, Sep. 2023, doi: 10.1186/S41231-023-00154-8.
- [279] J. Liao *et al.*, "De novo analysis of bulk RNA-seq data at spatially resolved single-cell resolution," *Nature Communications 2022 13:1*, vol. 13, no. 1, pp. 1–19, Oct. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-34271-z.
- [280] D. Pelzer, L. S. Phipps, R. Thuret, C. J. Gallardo-Dodd, S. M. Baker, and K. Dorey, "Foxm1 regulates neural progenitor fate during spinal cord regeneration," *EMBO Rep*, vol. 22, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.15252/EMBR.202050932.