

ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS GENES NANOG POSTEMBRIONARIO EN COMPARACIÓN CON EL *AMBYSTOMA MEXICANUM*

STUDY OF GENES INACTIVATION PHYLOGENETIC NANOG POSTEMBRYONIC COMPARED WITH *AMBYSTOMA MEXICANUM*

Yurley Rosany Tatiana Ortega García¹, Carlos Hernando Parga Lozano²

RESUMEN

Introducción: El proceso de regeneración puede ocurrir en múltiples niveles de la organización biológica y la habilidad de los diferentes organismos para regenerar partes faltantes es altamente variable. El gen Nanog es un factor de transcripción en células madre embrionarias; se cree que es clave en el mantenimiento de la pluripotencia.

Objetivo: Determinar la filogenia de la inactivación de los genes Nanog postembrionario en comparación con el *Ambystoma mexicanum*.

Materiales y métodos: Se utilizó un diseño cualitativo, basado en la revisión y recolección de las secuencias genómicas con datos del Genbank, donde se compararon las secuencias de nucleótidos por BLAST, se trabajó con el software de alineamiento genético MEGA, para alinear las secuencias y se construyeron dendogramas de Neighbor Joining.

Resultados: Se observó que las especies con mayor similitud con el *Ambystoma mexicanum* son las aves, al contar con una distancia evolutiva menos amplia que la del *Homo sapiens*, entre las que encontraron *Taeniopygia guttata*, *Zonotrichia albicollis*, una especie en particular es el *Ornithorhynchus anatinus*.

Conclusión: El *Ambystoma mexicanum* y el *Homo sapiens* presentan un alto grado de distancia genética por ser pocas las secuencias genómicas del gen Nanog que comparten, en comparación con otras especies que comparten más secuencias genómicas. Se cree que para inducir la regeneración en humanos lo mejor sería poder reproducir los procesos que la naturaleza nos muestra en animales como la salamandra. Este proceso parece bloquear la formación del blastema. En principio, los genes o moléculas que atenúan la inflamación o que bloquean la remodelación de la matriz podrían favorecer una respuesta regenerativa al impedir la cicatrización.

Palabras clave: Evolución, Filogenia, Gen Nanog, Postembrionaria, Regeneración.

ABSTRACT

Introduction: The process of regeneration can occur at multiple levels of biological organization and the ability of different organism to regenerate missing parts is highly variable, however, the ability to regenerate at least some structure is common to all animals. The Nanog gene is a transcription factor in embryonic stem cells is believed to be key in maintaining pluripotency.

Objective: Determine phylogeny the inactivation of genes Nanog postembryonic compared *Ambystoma mexicanum*.

Materials and methods: A qualitative design which is based on the review and collection of genomic sequences using Genbank data, where the nucleotide sequences were compared by BLAST, the genetic alignment MEGA software was used to align the sequences was used and they built dendograms Neighbor Joining.

Results: It was found that those with high similarity to *Ambystoma mexicanum* are birds, to have less extensive evolutionary distance between *Homo sapiens* which *Taeniopygia guttata*, *Zonotrichia albicollis*, a particular species is found *Ornithorhynchus anatinus*.

Conclusion: *Ambystoma mexicanum* and *Homo sapiens*, has a high degree of genetic distance being few genomic sequences share the Nanog gene, compared to other species that share more genomic sequences. Is believed to induce regeneration in humans would be best to replicate the processes that nature shows in animals like the salamander. In humans the healing process which could not contribute to the regeneration. This process appears to block blastema formation occurs. In principle, genes or molecules that attenuate inflammation or blocking matrix remodeling might favor a regenerative response, to prevent scarring.

Keywords: Evolution, Phylogeny, Gen Nanog, Postembryonic, Regeneration.

Recibido: Agosto 12 de 2014

Aceptado: Septiembre 9 de 2014

1. Médico (C). Universidad del Sinú Seccional Cartagena. Grupo de Farmacoterapia e Inmunología.

2. Químico Farmacéutico MSc PhD Inmunología. Universidad Libre Seccional Barranquilla. cparga@unilibrebaq.edu.co

INTRODUCCIÓN

El proceso de regeneración puede ocurrir en múltiples niveles de la organización biológica, la habilidad de los diferentes organismos para esto es altamente variable, sin embargo esta capacidad es común en todos los animales (1). El mecanismo puede darse entonces a nivel celular, de tejido, órgano, estructura e incluso del cuerpo entero pero en algunos organismos no se da o es altamente limitada (1-2). La renovación de extremidades faltantes se presenta en múltiples organismos: salamandras, cangrejos y estrellas de mar, entre otros (2), y en individuos enteros a partir de pequeños fragmentos en planarias y varios cnidarios (3). Por otro lado hay organismos como las aves y los nemátodos que son prácticamente incapaces de cualquier tipo de regeneración (1). Las formas más simples de vida son células unicelulares que se propagan dividiéndose en dos (4). Los organismos superiores son aquellos que están constituidos por dos o más células, en contraposición a los organismos unicelulares que reúnen todas sus funciones vitales en una única célula que realiza funciones especializadas (5).

A lo largo de todo este tiempo, se han propuesto teorías y desarrollado conceptos que tratan de explicar cómo se recupera una parte de un órgano o tejido e incluso una estructura compleja completa cuando se pierde por razones diversas. En este punto es importante resaltar la diferencia entre reparación y regeneración. La reparación es un proceso que sustituye el tejido dañado o perdido por otro que «cura», es decir, que permite, al menos de forma parcial, la viabilidad del tejido u órgano pero no mantiene su identidad estructural ni funcional. Entonces, así entendida, esta es típica en vertebrados adultos como aves y mamíferos. Sin embargo,

supone la sustitución del tejido perdido por otro igual que conserva la estructura y funcionalidad del original; es una característica propia de numerosos invertebrados y de algunas estructuras de ciertos vertebrados adultos, principalmente anamniotas (peces y anfibios) (6-9).

De esta manera tiene dos características importantes. En primer lugar, la capacidad de producir el blastema, una estructura especializada que dirige la formación del órgano perdido. Por otro lado, la memoria, ya que siempre se regenera solo la parte que falta, y esto implica que las células que van a iniciarse de esta forma saben a qué nivel se ha producido la amputación (9-12). Todo comienza con la formación del blastema, que está relacionado con una flexibilidad en el proceso de diferenciación celular. Esta estructura está compuesta por células que se acumulan en el lugar de la herida y que son totipotentes, es decir, son capaces de dar lugar a todo tipo de tejidos, como las células primigenias del embrión (13). Tras cerrarse la herida, estas células no diferenciadas se dividen para producir más células y luego se especializan para generar las estructuras necesarias: músculo, hueso, tendones, entre otros. Lo que distingue a los distintos animales regeneradores es el origen de estas células del blastema. En unos casos son células madre preexistentes que son reclutadas al lugar de la amputación (14, 15). Para las planarias, donde este tipo de células están distribuidas por todo el cuerpo y constituyen hasta el 20 % del total del organismo (16-19). En otros, como en la salamandra, son células musculares cercanas a la herida las que, en un sorprendente proceso deconstrutivo de marcha atrás, se desdiferencian, adquieren la potencialidad de células madre y regeneran los tejidos. Pero para que la regeneración sea efectiva, las células deben

saber qué es lo que deben reconstruir; no solo dónde fabricar hueso y dónde músculo, sino también qué hueso y qué músculo. Esta información podría estar presente en el entorno de la amputación (en las células próximas que, de alguna manera, la transmitirían a las regeneradoras), o en las propias células madre o desdiferenciadas, por algún mecanismo de memoria molecular aún desconocido. Un abordaje para promover la regeneración en humanos sería conseguir la presencia de células madre en la herida (18-20).

Las células madre tienen la cualidad tanto de regenerar como de reparar: en principio son capaces de generar todos los tipos celulares presentes en un animal. Una posibilidad por lo tanto sería reclutar este tipo de células al lugar de la herida (21). El problema es que los humanos no disponen de gran cantidad de células madre totipotentes repartidas por el cuerpo como las planarias. Si bien es cierto que existen las células madre adultas, encargadas de la renovación de los tejidos, estas se encuentran en escaso número, no son fácilmente reclutables al producirse una herida y además tienen una capacidad de diferenciación limitada, no pudiendo generar todos los tipos de tejido sino solo un subconjunto (22,23). Por eso surge la idea de identificar uno de los genes que participan en la regeneración en este caso el gen Nanog, que se encuentra presente en la embriogénesis al igual que en el *Ambystoma mexicanum* a la hora de regenerar una de sus extremidades amputadas.

Nanog es un factor de transcripción involucrado en la autorrenovación de indiferenciadas células madre embrionarias. En los seres humanos, esta proteína es codificada por el gen Nanog. La proteína Nanog es esencial para la reprogramación de

células adultas en células madre, donde se da el proceso de selección en la regeneración para cada una de las células que hacen parte de los tejidos amputados. Las células de un organismo pluricelular están estrechamente relacionadas al haberse formado recientemente a partir de una célula, en el estado fundamental pluripotente pueden dar lugar a células somáticas y las células germinales, y la adquisición de la pluripotencia es dependiente de la expresión de Nanog (5,24-25). La pluripotencia se conserva en el ectodermo primitivo de embriones de mamíferos y anfibios urodele y aquí se presenta el aislamiento de un Nanog ortólogo de ajolotes (axNanog). axNanog no contiene un dominio de repetición de triptófano y se expresa como un monómero en el casquillo animal axolotl (2,26). La forma monomérica es suficiente para regular la pluripotencia de las células madre embrionarias de ratón, pero dímeros como el axNanog están obligados a rescatar a la autorrenovación independiente. Los resultados de varios estudios muestran que las interacciones proteínicas mediadas por Nanog de dimerización promueven la proliferación. Más importante aún, demuestran que los mecanismos que regulan la pluripotencia se conservan desde urodele anfibios a mamíferos (20,27-28).

Los organismos unicelulares han tenido éxito al adaptarse a una gran variedad de ambientes distintos, esto ha permitido que algunos de ellos se dividan más de una vez cada hora. Sin embargo, los organismos pluricelulares pueden explotar recursos que ninguna célula aislada podría utilizar. La pluricelularidad hace que una planta llegue a ser físicamente grande, que tenga raíces en el suelo, donde un grupo de células puede absorber agua y nutrientes, y que posea hojas en el aire, para que otro grupo de células puede captar eficazmente

energía radiante del sol (14-16). La distribución filogenética de la regeneración también indica que esta capacidad se restringió y/o perdió en repetidos eventos (17).

El estado fundamental de la pluripotencia es la característica de las células madre embrionarias (CME), la definición de las células con el potencial de producir cualquier tipo de células somáticas o células germinales primordiales (PGC), que establecen la línea germinal. Durante el desarrollo del ratón, la expresión del factor de transcripción Nanog es esencial para el establecimiento de la pluripotencia en el ectodermo primitivo (epiblasto). Nanog se ha demostrado recientemente para nucleótidos de determinados genes y de aminoácidos de ciertas proteínas (29-31).

También actúa como un regulador maestro de la pluripotencia y su activación marca un paso final en la adquisición de pluripotencia durante el desarrollo, o en la reprogramación de núcleos somáticos. Nanog existe ortólogos en polluelo y Anolis (que representa los reptiles), sin embargo, recientemente una secuenciación de *Xenopus tropicalis* demuestra que el genoma de la rana no contenía el gen Nanog ortólogo lo que plantea la cuestión de cómo evoluciona pluripotencialmente en amniota (1,32-33). Aquí demostraremos un Nanog ortólogo de ajolotes para verificar su identidad mediante mapeo comparativo, análisis estructural, y los estudios funcionales en comparación con los del ser humano, esto con el fin de identificar la manera de reactivar el proceso molecular de la regeneración celular así como se dio a nivel embrionario la generación de órganos. Hay animales que pueden hacer precisamente eso. En el caso de los ajolotes, por ejemplo, esta propiedad parece relacionada con el

mantenimiento de un estado larvario de por vida (algo que se denomina en biología neotenia) (8,33).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinó utilizar un diseño cualitativo, el cual se basa en la revisión y recolección de secuencias genómicas para encontrar la relación filogénica entre el ser humano y el *Ambystoma*, teniendo en cuenta el poder regenerativo y cómo este se ha perdido en la escala evolutiva sin utilizar datos cuantitativos (34-35). El proyecto se inició con la búsqueda y organización de datos con base bibliográfica de ncbi.nlm.nih.gov y su herramienta Genbank, por medio de la cual encontramos las secuencias de genes de las especies a estudiar y se analizará la relación entre sí a través de la herramienta BLAST y del programa genético MEGA en el cual se alinearon las especies estudiadas que se pueden observar en la Tabla 1. La revisión bibliográfica además se apoya en el empleo de documentos,

Tabla 1. Especie, grupo poblacional y género de las especies estudiadas

Especie	Grupo poblacional	Género
<i>Ambystoma mexicanum</i>	<i>Ambystomatidae</i>	<i>Ambystoma</i>
<i>Homo sapiens</i>	<i>Hominidae</i>	<i>Homo</i>
<i>Macaca fascicularis</i>	<i>Cercopithecidae</i>	<i>Macaca</i>
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>Estrildidae</i>	<i>Taeniopygia</i>
<i>Ficedula albicollis</i>	<i>Muscicapidae</i>	<i>Ficedula</i>
<i>Pseudopodoces humilis</i>	<i>Paridae</i>	<i>Pseudopodoces</i>
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	<i>Ornithorhynchidae</i>	<i>Ornithorhynchus</i>
<i>Geospiza fortis</i>	<i>Thraupidae</i>	<i>Geospiza</i>
<i>Zonotrichia albicollis</i>	<i>Emberizidae</i>	<i>Zonotrichia</i>
<i>Pan troglodyte</i>	<i>Hominidae</i>	<i>Pan</i>
<i>Pan paniscus</i>	<i>Hominidae</i>	<i>Pan</i>
<i>Macaca mulatta</i>	<i>Cercopithecidae</i>	<i>Macaca</i>
<i>Papio anubis</i>	<i>Cercopithecidae</i>	<i>Papio</i>

como artículos, periódicos, libros, entre otros. Por su parte, el análisis y comparación se realizarán teniendo en cuenta los dendrogramas y datos arrojados por MEGA (36-38).

Se muestran más adelante los resultados obtenidos, en algunas secuencias aparece una serie de puntos que indican los nucleótidos iguales en las especies que se comparan con la especie en observación que es el *Ambystoma mexicanum*, en el lugar donde los nucleótidos difieren aparece la letra que corresponde al nucleótido (25,39-40).

RESULTADOS

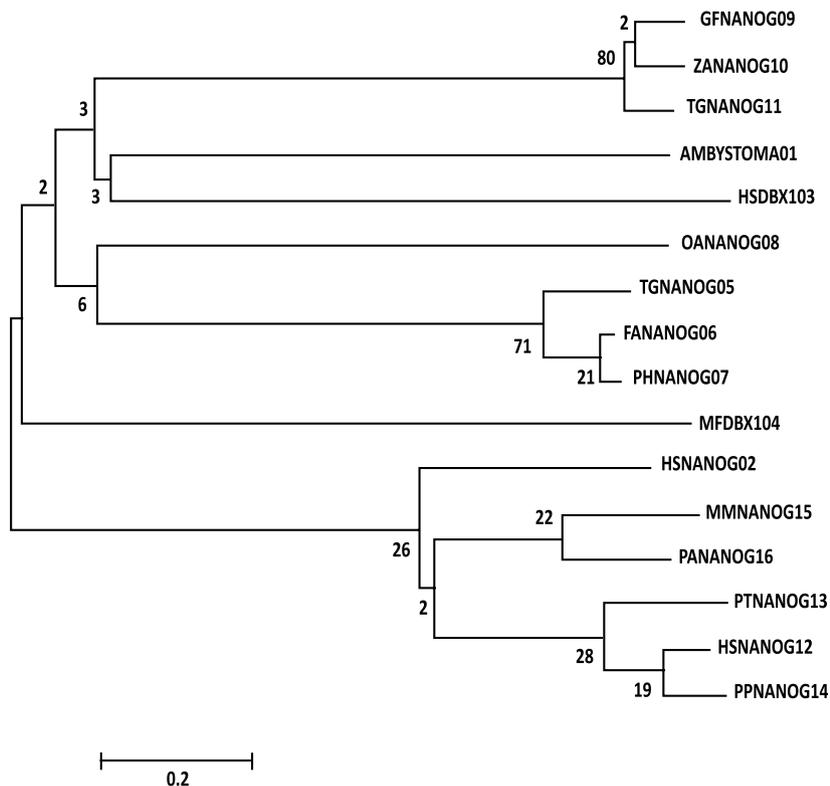
Como se aprecia en la Figura 1, las especies que

más similitudes tienen con el *Ambystoma* son las aves, al contar con una distancia evolutiva menos amplia que la del *Homo sapiens*, como por ejemplo, *Taeniopygia guttata*, *Zonotrichia albicollis*, una especie en particular es el *Ornithorhynchus anatinus*, que estando entre los mamíferos tiene más relación con el *Ambystoma*. El mayor grado de divergencia es presentado por los primates como *Homo sapiens*, *Macaca fascicularis*, *Pan troglodyte*, *Pan paniscus*, *Macaca mulatta* y *Papio anubis*.

DISCUSIÓN

Desde la antigüedad, el humano se ha interesado en el proceso de la regeneración, probablemente por el deseo de recuperar estructuras del cuerpo

Figura 1. Neighbor Joining con las secuencias genéticas del gen Nanog en las respectivas especies estudiadas, para observar su lejanía o cercanía filogenética del *Ambystoma mexicanum* durante su evolución. Cada una de las especies fue codificada así: la primera letra significa el género, la segunda letra la especie, Nanog el gen y el número el código de este estudio



GF: *Geospiza fortis*; ZA: *Zonotrichia albicollis*; TG: *Taeniopygia guttata*; HS: *Homo sapiens*; OA: *Ornithorhynchus anatinus*; FA: *Ficedula albicollis*; PH: *Pseudopodoces humilis*; MF: *Macaca fascicularis*; MM: *Macaca mulatta*; PA: *Papio anubis*; PT: *Pan troglodyte*; PP: *Pan paniscus*

perdidas por alguna lesión o enfermedad (41-42). El estudio de la regeneración, ha llevado a considerar el proceso como un mecanismo molecular evolutivamente conservado. Para fines de estudio, podemos decir que la regeneración ocurre por cuatro mecanismos: 1. la regeneración mediada por células troncales residentes. 2. La epimorfosis caracterizada por la formación de un blastema. 3. La morfolaxis, en la cual el tejido restante se reorganiza para reconstruir la morfología original y 4. La regeneración compensatoria, que se enfoca en la recuperación de la función, y no de la forma, mediante la proliferación y restauración de la masa tisular funcional (31,43-44). El conocimiento generado a partir de los estudios básicos en modelos animales, permite generar la expectativa que en un futuro la Medicina Regenerativa logre avances importantes y proponga pensar en la restauración o reemplazo de tejidos, órganos o estructuras complejas en los humanos (17,45-46).

En el dendrograma se pueden observar regiones de similitud y de divergencia en el proceso evolutivo de las especies teniendo en cuenta el gen *Nanog* y partiendo del *Ambystoma mexicanum* (47). Se aprecia que la especie que más similitudes tiene con el *Ambystoma* son las aves, debido a que su distancia evolutiva es menos amplia, como por ejemplo, *Taeniopygia guttata* (ave), *Zonotrichia albicollis* (ave); una especie en particular es el *Ornithorhynchus anatinus* que estando entre los mamíferos tiene más relación con el *Ambystoma*, estas bases genéticas concuerdan con el estilo de vida del *Ornithorhynchus*, semiacuático similar al *Ambystoma*. Por último tenemos el mayor grado de divergencia, presentado por los primates como *Homo sapiens*, *Macaca fascicularis*, *Pseudopodoces humilis*, *Pan troglodyte*, *Pan paniscus*, *Macaca mulatta* y *Papio anubis* (48-50).

El paso que parece ser esencial en cualquier regeneración es la capacidad de producir un blastema, y esto, como casi todo en la naturaleza, es un asunto de competición. En los animales regeneradores, la formación del blastema es más rápida y eficiente que la formación de una cicatriz como consecuencia de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, en los animales que no pueden regenerar, se activa de forma intensa el proceso de inflamación tras producirse una herida. En él participan macrófagos y otras células inmunitarias y tiene lugar una gran remodelación de la matriz extracelular, dando como consecuencia el cierre de la herida y la formación de una cicatriz. Inhibiendo así la expresión del gen *Nanog* en muchas especies, pero en otras como el *Ambystoma* no tiene cicatrización haciendo que se exprese así el gen en ellas y se dé el proceso de regeneración celular a partir de la formación del blastema.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los procesos de secuenciación y alineamiento que se realizaron, la relación entre el *Ambystoma mexicanum* y el *Homo sapiens* presentan un grado alto de discrepancia, por ser pocas las secuencias genómicas del gen *Nanog* que comparten las especies. Tradicionalmente se asume que los primeros tetrápodos se desarrollaron en hábitat de agua dulce bajos y pantanosos hacia el final del Devónico, hace poco más de 360 millones de años. Estos organismos se originaron a partir de un antepasado común y los peces de aletas lobuladas conservando aún agallas y escamas, pero que en lugar de aletas presentaban patas anchas y aplanadas con un gran número de dedos. En este grupo terminó la convergencia de los *Homo sapiens* con el *Ambystoma*, ya que este último tomó el camino evolutivo amphibian y los *Homo sapiens* los amnio-

tas, los cuales muy tempranamente en dos grandes líneas evolutivas; por un lado, los sinápsidos que culminan en los mamíferos y por otro, los saurópsidos, el linaje que derivó en los reptiles actuales y las aves, pero que también incluye muchos grupos extintos como dinosaurios, pterosaurios, plesiosaurios, ictosaurios, entre otros, sin embargo se sabe que las interacciones proteínicas mediadas por Nanog promueven la proliferación celular. Más importante aún, demuestran que los mecanismos que regulan la pluripotencia se conservan desde urodele, anfibios a mamíferos. Se cree que para inducir la regeneración en humanos lo mejor sería poder reproducir los procesos que la naturaleza nos muestra en animales como la salamandra. En esta especie se da el proceso de cicatrización lo que podría no contribuir a la regeneración. Este proceso parece bloquear la formación del blastema. En principio, los genes o moléculas que atenúan la inflamación o que bloquean la remodelación de la matriz podrían favorecer una respuesta regenerativa al impedir la cicatrización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Polit DF, Hungler BP. Diseño y métodos en la investigación cualitativa. En: Polit DF, Hungler BP (eds). Investigación científica en ciencias de la salud. 6a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000. pp. 231-47.
2. Anderson J, Reisz R, Scott D, Frobisch N, Sumida S. A stem batrachian from the early Permian of Texas and the origin of frogs and salamanders. *Nature*. 2008; 453:515-18.
3. Bachvarova R, Masi T, Drum M, Parker N, Mason K, Patient R, Johnson D. Gene expression in the axolotl germ line: *Axdazl*, *Axvh*, *Axoct-4*, and *Axkit*. *Dev. Dyn*. 2004; 231:871-80.
4. Bachvarova F, Crother I, Johnson D. Evolution of germ cell development in tetrapods: comparison of urodeles and amniotes. *Evol. Dev*. 2009; 11:603-9.
5. Bachvarova F, Crother I, Manova K, Chatfield J, Shoemaker C, Crews D, Johnson A. Expression of *Dazl* and *Vasa* in turtle embryos and ovaries: evidence for inductive specification of germ cells. *Evol. Dev*. 2009; 11:525-34.
6. Brons I, Smithers L, Trotter M, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva. Pedersen R, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007; 448:191-5.
7. Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*. 2008; 135:1287-98.
8. Hamazaki T, Oka M, Yamanaka S, Terada N. Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *J. Cell Sci*. 2004; 117:5681-6.
9. Johnson A, Bachvarova R, Drum M, Masi T. Expression of axolotl *DAZL* RNA, a marker of germ plasm: widespread maternal RNA and onset of expression in germ cells approaching the gonad. *Dev. Biol*. 2001; 234:402-15.
10. Johnson A, Drum M, Bachvarova R, Masi T, White M, Crother B. Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution. *Evol. Dev*. 2003; 5:414-31.
11. Lyons I, Parsons L, Hartley L, Li R, Andrews J, Robb L, Harvey P. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev*. 1995; 9:1654-66.

12. Yuri S, Fujimura S, Nimura K, Takeda N, Toyooka Y, Fujimura Y, et al. Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency, of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem Cells*. 2009; 27:796-805.
13. Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz MA, Swiergiel J, Marshall V, Jones J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-47.
14. Wang J, Rao S, Chu J., Shen X, Levasseur D, Theunissen T, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2006; 444:364-8.
15. Wang J, Levasseur D, Orkin S. Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105:6326-31.
16. Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane J, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318:1917-20.
17. Carlson BM. Some principles of regeneration in mammalian systems. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*. 2005; 287B:4-13.
18. Harty M, Neff AW, King MW, Mescher A. Regeneration or scarring: An immunologic perspective. *Developmental Dynamics*. 2003; 226:268-79.
19. Kragl M, Knapp D, Nacu E, Shahryar K, Malcolm M, Hans D. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*. 2009; 460:60-5.
20. Kawakami Y, Rodriguez Esteban C, Raya M. Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes & Development*. 2006; 20:3232-7.
21. Yokoyama H, Ogino H, Stoick-Cooper CL, Granger RM, Moon RT. Wnt/ β -catenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration. *Developmental Biology*. 2007; 306:170-8.
22. Kumar A, Godwin JW, Gates PB, Garza-Garcia AA, Brockes JP. Molecular Basis for the Nerve Dependence of Limb Regeneration in an Adult Vertebrate. *Science*. 2007; 318:772-7.
23. Satoh A, Gardiner DM, Bryant SV, Endo T. Nerve-induced ectopic limb blastemas in the axolotl are equivalent to amputation-induced blastemas. *Developmental Biology*. 2007; 312:231-44.
24. Kawakami A. Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Development, Growth & Differentiation*. 2010; 52:77-87.
25. Tiniakos DG, Kandilis A, Geller SA. Tityus: A forgotten myth of liver regeneration. *Journal of Hepatology*. 2010; 53:357-61.
26. Power C, Rasko JEJ. Whither Prometheus' Liver? Greek Myth and the Science of Regeneration. *Annals of Internal Medicine*. 2008; 149:421-6.
27. Ingham JM. Human Sacrifice at Tenochtitlan. *Comparative Studies in Society and History*. 1984; 26:379-400.
28. Lenhoff HMLySG. Abraham Trembley and the origins of research on regeneration in animals. In: Dinsmore CE, ed. *A history of regeneration research: milestones in the evolution of a science*. Nueva York: Cambridge University Press; 1991. pp.47-66.
29. Tsonis PA, Fox TP. Regeneration according to Spallanzani. *Developmental Dynamics*. 2009; 238:2357-63.
30. Géraudie MSyJ. The neurotrophic phenomenon: its history during limb regeneration in the newt. In: Dinsmore CE, ed. *A history of regeneration research: milestones in the*

- evolution of a science. Nueva York: Cambridge University Press; 1991. pp.101-12.
31. Alvarado AS. Regeneration in the metazoans: why does it happen? *BioEssays*. 2000; 22:578-90.
 32. Agata K, Saito Y, Nakajima E. Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Development Growth & Differentiation*. 2007; 49:73-78.
 33. Galliot B, Ghila L. Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Molecular Reproduction and Development*. 2010; 77:837-55.
 34. Poss KD. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet*. 2010; 11:710-22.
 35. Santos-Ruiz L, Santamaria JA, Ruiz-Sanchez J, Becerra J. Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. *Developmental Dynamics*. 2002; 223:262-72.
 36. Nye HLD, Cameron JA, Chernoff EAG, David L. Regeneration of the urodele limb: A review. *Developmental Dynamics*. 2003; 226:280-94.
 37. Nimeth K, Egger B, Rieger R, et al. Regeneration in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes): cellular dynamics in the neoblast stem cell system. *Cell and Tissue Research*. 2007; 327:637-46.
 38. Galliot B, Chera S. The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends in Cell Biology*. 2010; 20:514-23.
 39. Call MK, Tsonis PA. Vertebrate Limb Regeneration. In: Yannas IV, ed. *Regenerative Medicine I*: Springer Berlin/Heidelberg; 2005. pp.67-81.
 40. Congdon KL, Voermans C, Ferguson EC, DiMascio LN, Uqoezwa M, Zhao C. Activation of Wnt Signaling in Hematopoietic Regeneration. *Stem Cells*. 2008; 26:1202-10.
 41. Yen T-H, Wright N. The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2006; 2:203-12.
 42. Neal MD, Richardson WM, Sodhi CP, et al. Intestinal Stem Cells and Their Roles During Mucosal Injury and Repair. *Journal of Surgical Research*. 2011; 167:1-8.
 43. Cordero JB, Sansom OJ. Wnt signalling and its role in stem cell-driven intestinal regeneration and hyperplasia. *Acta Physiologica*. 2012 Jan; 204(1):137-143.
 44. Lade AG, Monga SPS. Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: Which way does the WNT blow? *Developmental Dynamics*. 2011; 240:486-500.
 45. Adell T, Cebrià F, Saló E. Gradients in Planarian Regeneration and Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2(1):1-13.
 46. Lin H, Schagat T. Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells. *Trends in Genetics*. 1997; 13:33-9.
 47. Alvarado AS, Tsonis PA. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet*. 2006; 7:873-84.
 48. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang WW, Chen X. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2006; 38: 431-40.
 49. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2005; 280: 24731-7.
 50. Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell*. 2006; 10:615-24.