



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“PAPEL DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE WNT DURANTE LAS
DIFERENTES ETAPAS DE LA REGENERACIÓN DE LA
EXTREMIDAD”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
SABINA CITLALI WISCHIN FUENTES

DIRECTOR DE TESIS
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA
DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO. NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"Denk darüber sorgsam nach, dass Du nicht dem Teufel des Ehrgeizes und der Eitelkeit zum Opfer fällst. Bedenke auch: nicht die Sehnsucht nach Leistung sondern nur die Liebe zu den Dingen kann zu was rechtem führen."

"Piénsalo cuidadosamente para que no caigas víctima del diablo de la ambición y de la vanidad. Toma también en cuenta: no el afán de logro, sino sólo el amor por las cosas puede conducir a algo que vale la pena."

(Fragmento de una carta de Albert Einstein a su hijo)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección y en el laboratorio del Dr. Jesús Chimal Monroy del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo fue parcialmente financiado por los fondos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a los proyectos 168642, por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM a los proyectos IN213314, fundación Miguel Alemán.

Agradezco:

Al CONACYT por la beca para realizar estudios de posgrado con número de registro 260634.

A los revisores y jurado de este trabajo: Dra. Diana María Escalante Alcalde, Dra. Martha Robles Flores, Dra. Rosa Estela Navarro González, Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez y Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar.

Al Dr. Jesús Chimal Monroy por su dirección, asesoría y colaboración.

A la Dra. Martha Robles Flores y al Dr. Luis Covarrubias, miembros del Comité Tutorial, por su asesoría.

A la Maestra en Ciencias Marcia Bustamante Zepeda por su asistencia técnica.

A Raúl Ruvalcaba Morales, David Garciadiego-Cázares, Gabriel Orozco-Hoyuela y a Miguel Tapia Rodríguez, por la ayuda técnica.

A la Dra. Cecilia Vanegas, a Felipe Correa Sánchez, José Feliciano Olvera, Horacio Mena González, el Dr. Luis Zambrano, Mto. Fernando Arana y Enrique Godinez, por la donación de las larvas de ajolote.

A la licenciada Lucía Brito Ocampo y María Petra Muñoz García, por su apoyo bibliotecario.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y camaradería.

A mis amigos con los que compartí casa a lo largo de esta etapa de mi vida, por hacer de ella un hogar.

A todas las personas que de alguna manera me apoyaron para que este proyecto fuera posible.

A mis padres y hermano, a mi pan y a mis hermosos hijos, por todo su amor y tantas horas de dicha.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
La regeneración de la extremidad	14
Etapas de la regeneración de la extremidad	16
Etapa de curación de la herida	16
Etapa de desdiferenciación	17
Formación del blastema	18
Morfogénesis.....	18
Crecimiento	19
Características importantes que permiten la regeneración de la extremidad	19
El epitelio de la herida en la regeneración de la extremidad	19
El papel de los nervios durante la regeneración de la extremidad	22
Relación entre el epitelio y los nervios en la regeneración de la extremidad	22
La vía de señalización Wnt/ β -catenina.....	23
El papel de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante el desarrollo embrionario de la extremidad.....	25
Señalización Wnt/ β -catenina en la iniciación del desarrollo embrionario de la extremidad	25
Señalización Wnt/ β -catenina en el crecimiento de la extremidad durante el desarrollo embrionario.....	25

Señalización Wnt/ β -catenina durante la formación de patrones en el desarrollo embrionario de la extremidad	26
Señalización Wnt/ β -catenina durante la morfogénesis en el desarrollo embrionario de la extremidad.....	26
El papel de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la regeneración de la extremidad en el Pez cebra y en <i>Xenopus</i>	27
La vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la regeneración de la extremidad en Urodelos	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS	36
Obtención y mantenimiento de los ajolotes.....	36
Eclosión de quistes de artemia.....	36
Cirugías	37
Amputación	37
Denervación	37
Tratamiento con el fármaco agonista de Wnt.....	38
Tinción de esqueleto	39
Tinción Tricrómica de Masson.....	39
Inmunohistoquímicas	40
Extracción de RNA.....	41
Síntesis de cDNA	41

RT-PCR.....	41
Cultivo celular.....	42
Transfección y ensayo de reportero de luciferasa.....	42
Índice mitótico	43
Hibridación <i>in situ</i> en cortes	43
RESULTADOS.....	44
Durante el proceso de regeneración de la extremidad del ajolote la actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina se localiza en las células de Leydig.....	44
El fármaco agonista de Wnt activa la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en la piel de la extremidad	47
El fármaco agonista de Wnt activa la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la línea celular de cáncer de colon RKO.....	47
EL fármaco agonista de Wnt incrementa la vía de señalización Wnt/ β -catenina en las células de Leydig durante la regeneración de la extremidad del ajolote.....	49
El fármaco agonista de Wnt afecta la expresión de genes blanco de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la regeneración de extremidades	50
Estructura esquelética de una extremidad anterior de ajolote.....	52
Al activar químicamente la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes etapas de regeneración de la extremidad del ajolote el proceso de regeneración se ve afectado de manera negativa en dos ventanas de tiempo	53
La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la etapa de curación de la herida afecta de manera negativa el proceso de regeneración en los tratamientos dados a las 0 y 24 hpa.....	53

La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la etapa de formación del blastema no se ve afectada de manera negativa en los tratamientos dados a los 7dpa, sin embargo, produce malformaciones esqueléticas en los tratamientos dados a los 10 y 12 dpa.....	54
La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la etapa de morfogénesis no causa grandes anomalías en la extremidad regenerada	56
Las extremidades tratadas con el agonista de Wnt no son capaces de recuperarse si se les permite regenerar por un periodo más prolongado	58
Las extremidades que no regeneran debido al tratamiento con el agonista de Wnt desarrollan una cicatriz	59
La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en etapas anteriores a la formación del blastema inhibe la futura formación del blastema	60
La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en etapas previas a la formación del blastema inhibe la innervación del muñón de la extremidad	61
La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina induce proliferación en la etapa de formación del blastema aún en extremidades denervadas.....	63
La organización del tejido esquelético es anormal en animales tratados con el fármaco agonista de Wnt en etapas posteriores a la formación del blastema.....	66
El tratamiento con el agonista de Wnt no afecta la expresión de <i>sox9</i>	67
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES.....	77
PERSPECTIVAS.....	78
REFERENCIAS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

aAG = Axolotl Anterior Gradient

AEC = Apical Epithelial Cap; Capa del Epitelio Apical

AER = Apical Ectodermal Ridge; Cresta Ectodérmica Apical

Ag. Wnt = Agonista de Wnt/ 2-Amino-4-(3,4-(methylenedioxy)benzylamino)-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidin

APC = Adenomatous polyposis coli

AR = Retinoic Acid; Ácido Retinoico

BIO = 6-bromoindirubin-3'-oxime

BMP = Bone Morphogenetic Protein; Proteína Morfogenética del Hueso

cDNA = Complementary DNA; DNA complementario.

CK1 α = Casein kinase 1 α ; Caseína cinasa 1 α

c-MYC = myelocytomatosis oncogene

Ctr = Control

DAPI = 4', 6-diamidino-2-phenylindole; 4', 6-diamino-2-fenilindol

DKK = Proteína Dickkopf

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Deoxyribonucleic Acid; Ácido Desoxirribonucleico.

Dpa = días post amputación

Dvl = Dishevelled

EF1 α = Elongation factor 1 α ; Factor 1 α de elongación peptídica

EGF = Epidermal Growth Factor; Factor de Crecimiento Epidérmico

FGF = Fibroblast Growth Factor; Factor de Crecimiento Fibroblástico.

GSK-3 β = Glycogen Synthase Kinase 3 β ; Glucógeno Sintasa Cinasa 3 β

Hpa = horas post amputación

LEF = Lymphoid Enhancer Factor; Factor Estimulador Linfoide

LMX1B = LIM Homeobox Transcription Factor 1-Beta

LRP5/6 = Lipoprotein receptor-Related Protein 5/6; Proteínas Relacionadas con Receptores de Lipoproteínas de Baja Densidad 5/6

nAG = Newt Anterior Gradient

PFA = Paraformaldehido

PHH3 = Phosphohistone H3/ Fosfohistona H3

RNA = Ribonucleic Acid; Ácido Ribonucleico.

RT-PCR = Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa.

RUNX2 = Runt-related Transcription Factor 2; Factor de Transcripción Relacionado con Runt 2

SAG = S-Antigen Visual Arrestin

Ser37 = Serina 37

SHH/Hh = Sonic Hedgehog/ Hedgehog

SOX 7/8/9 = SRY-box 7/8/9

SP7 = Specificity Protein 7

TBX = T-box

TCF = T-Cell Factor; Factor de Células T

TGF β = Transforming Growth Factor- β ; Factor de Crecimiento Transformante- β .

Thr41 = Treonina 41

TUNEL = Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling.

ZPA = Zone of Polarizing Activity; Zona de Actividad Polarizante

B-TRCP = Beta-Transducin Repeats-Containing Proteins

RESUMEN

La regeneración de la extremidad es un complejo proceso biológico que se divide en la etapa de curación de la herida, desdiferenciación, formación del blastema, morfogénesis y crecimiento. Se ha propuesto que la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina favorece el proceso de la regeneración de las extremidades al aumentar la proliferación celular. Sin embargo, es importante considerar que la vía de señalización Wnt/ β -catenina no tiene una función única, sino más bien, juega una gran cantidad de papeles, dependiendo del contexto celular. Durante el desarrollo embrionario de la extremidad, un proceso que comparte muchas características con la regeneración de la extremidad, la vía de señalización Wnt/ β -catenina requiere ser orquestada de manera adecuada para que se puedan llevar a cabo eventos de proliferación, formación de patrones, morfogénesis y condrogénesis; el resultado de la desregulación de la vía, ya sea activándola o inhibiéndola será diferente dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre. Hasta la fecha se desconoce cuál sería el efecto de activar de manera irregular esta vía de señalización en diferentes momentos a lo largo del proceso de regeneración de la extremidad de los urodelos. Debido a la similitud que comparten el desarrollo y la regeneración de las extremidades, se especuló que también durante la regeneración la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina tendrá diferentes efectos, además de activar la proliferación. Éstos dependerán del momento de la etapa de la regeneración en la que la vía sea activada. Con la finalidad de probar esta hipótesis, se colocó el fármaco agonista de Wnt, en diferentes períodos, a lo largo de las diferentes etapas del proceso de regeneración. Encontramos que hay periodos de tratamiento en los cuales la regeneración se ve afectada y otros en donde no. Los momentos donde se inhibe son dos: uno, cuando la droga es administrada al comienzo del proceso de regeneración, antes de la formación del blastema y el otro, cuando la droga se aplica posterior a la formación de blastema, justo al comienzo de la morfogénesis. También observamos que los ajolotes tratados al comienzo del proceso de regeneración no desarrollan un blastema debido a que el muñón no se innerva. Por otro lado, los

animales que son tratados con el agonista posteriormente, carecen de una organización del tejido esquelético.

ABSTRACT

Limb regeneration is a complex biological process which is divided in wound healing stage, dedifferentiation, blastema formation, morphogenesis and growth. It has been proposed that Wnt/ β -catenin signaling activation favors limb regeneration by increasing cell proliferation. It is important to take into account, however, that Wnt/ β -catenin signaling has not just one specific function, but plays a wide variety of roles, depending on the cellular context. During limb development, a process considered to be similar to limb regeneration, this signaling pathway requires to be well orchestrated, in order to accomplish processes such as proliferation, patterning, morphogenesis and chondrogenesis; the result of deregulating such pathway, either by activation or inhibition, will change depending on the stage of development. Until now, the effect of Wnt/ β -catenin signaling pathway deregulation at different moments during urodele limb development is unknown. Because of the similarities shared between limb development and limb regeneration, we speculated that also during limb regeneration the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway will have different effects, besides favoring proliferation, depending on the moment of the regeneration stage in which it is activated. In order to prove this hypothesis, we applied a Wnt agonist at different moments during the limb regeneration process. We found that there are periods when the application of the treatment affects regeneration but others when it is not. The moments in which limb regeneration is inhibited are two: one, when the drug is administered at the beginning of limb regeneration, before blastema is formed and other when the drug is applied after the blastema is formed, just before the onset of morphogenesis. We also observed that axolotls treated at the beginning of the limb regeneration process do not develop a blastema, due to the absence of innervation at the limb stump. On the other hand, at later stages of limb regeneration, the Wnt agonist causes a lack of structural organization in skeletal formation.

INTRODUCCIÓN

Casi todos los *phyla* poseen algún ejemplo de organismo que tiene la capacidad de regenerar alguna sección de su plano corporal. Este proceso involucra el reconocimiento de la pérdida de la estructura, seguido del mecanismo que permite la reconstrucción o restauración de dicha parte ([Brookes & Kumar 2008](#)).

Aunque el concepto de regeneración significa diferentes cosas para distintas personas y a pesar de que no hay un acuerdo general que limite el concepto, en la literatura de la regeneración se manejan dos términos que tratan de incluir los diferentes tipos de regeneración ya sea en uno u otro. Dichos términos son morfalaxis y epimorfosis. La morfalaxis se refiere al tipo de regeneración en la que una parte se transforma directamente en un organismo nuevo o parte de un organismo, y conlleva la falta de proliferación por parte de la superficie cortada. Ejemplos de este tipo de regeneración lo llevan a cabo organismos como la hidra. La epimorfosis engloba los tipos de regeneración que durante el proceso forman un blastema que se crea a través de la interacción entre el epitelio y el mesenquima y que contiene y expresa información morfogénica intrínseca. En este último concepto está englobado el proceso de regeneración de la extremidad ([Carlson 2007](#)).

La regeneración de la extremidad

La regeneración de la extremidad es un proceso biológico que entraña diversos eventos fisiológicos interrelacionados, permitiendo a un organismo restablecer la forma, estructura y función de la parte perdida del cuerpo ([Kawakami et al. 2006](#)).

Existen diversos tetrápodos que poseen la capacidad, en mayor o menor medida, de regenerar las extremidades. Los modelos que usualmente se emplean para este estudio son el pez cebra (*Danio reiro*), la rana *Xenopus* o urodelos como la salamandra, el tritón y el ajolote (fig. 1.1).

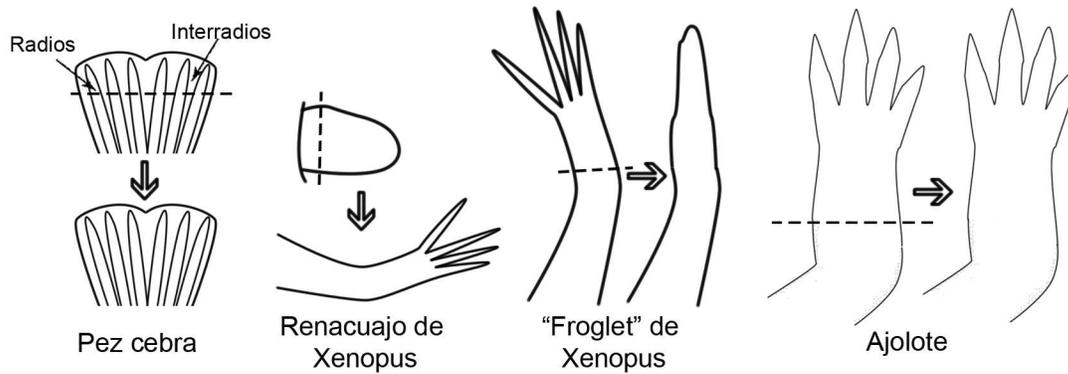


Figura 1.1 Los modelos más comunes de regeneración de la extremidad.

El pez cebra *Danio reiro*, la rana *Xenopus* como renacuajo y como rana adolescente, "froglet" y urodelos como los ajolotes, tritones o salamandras, son modelos comunes que se usan para estudiar la regeneración de las extremidades (Modificado de Susuki *et al.* 2006, Carlson 2007 y Wehner *et al.* 2014).

La regeneración de la aleta del pez cebra se da de manera rápida y fiable restaurando el tamaño y la forma de la aleta, una vez que ésta fue amputada. La estructura que puede regenerar consiste en los radios de esqueleto dérmico, segmentados y delineados por osteoblastos. Los radios son cilindros huecos con dos hemi-radios que rodean un tejido mesenquimático interno que está innervado, vascularizado y compuesto principalmente por fibroblastos ([Gemberling *et al.* 2013](#)).

La rana *Xenopus* tiene dos etapas en las que puede regenerar. Una de ellas es durante su estado larvario (renacuajo), en el que la capacidad va decayendo progresivamente conforme el animal avanza en su desarrollo. La regeneración completa de la extremidad se da hasta el estadio 50-51 a partir de lo cual declina y ya para el estadio 58 desaparece ([Dent 1962, Muneoka *et al.* 1986](#)).

La otra etapa de regeneración de *Xenopus* se da cuando ésta es una rana joven postmetamórfica (froglet). Sin embargo, este tipo de regeneración es incompleto pues la rana únicamente puede formar una protrusión larga de cartílago sin ramificar conocida como "spike". Dicha estructura carece de músculo, hueso mineralizado, articulaciones, tendones y ligamentos. Sin embargo, la formación de las glándulas de la piel ocurre de manera normal ([Suzuki *et al.* 2006](#)).

Por otro lado, los organismos a los que se les atribuye la mejor capacidad para regenerar son los urodelos, pues, no solo pueden regenerar a lo largo de toda su vida ilimitadamente, también tienen la capacidad de regenerar todo tipo de tejidos incluyendo músculo, nervios, tejido conectivo, dermis, epidermis, etc., a cualquier nivel que se le ampute ([Carlson 2007](#)).

En los urodelos, los eventos fisiológicos interrelacionados que permiten a una extremidad regenerar han sido clasificados en etapas, de distintas maneras ([Iten & Bryant 1973](#), [Smith et al. 1974](#), [Tank 1976](#), [Stocum 1979](#), [Carlson 2007](#)).

En este trabajo y en gran medida con base en la clasificación de las etapas de la regeneración de Carlson ([Carlson 2007](#)), se eligió dividir al proceso de regeneración en: etapa de curación de la herida, etapa de desdiferenciación, formación de blastema, morfogénesis y crecimiento (fig. 1.2).

Etapas de la regeneración de la extremidad

Etapas de curación de la herida

Inmediatamente después de la pérdida de la extremidad, los músculos del muñón se contraen retrayendo los tejidos suaves, de tal manera que los huesos pueden llegar a exponerse. Segundos después, el sangrado de los vasos principales se detiene debido a la contracción de las paredes vasculares ([Carlson 2007](#)). Posteriormente, el epitelio que circunda el muñón migra y cubre la herida ([Reפש & Oberpiller 1978; 1980](#)). Este proceso tiene una duración muy corta, comparada con la del humano en donde el proceso de curación toma de algunos días a algunas semanas dependiendo en parte en el tamaño de la herida, mientras que en los urodelos puede tardar de entre algunas horas a algunos días dependiendo también en parte, del tamaño de la extremidad amputada ([Carlson 2007](#), [Carlson et al. 1998](#)).

A diferencia del epitelio del resto de la extremidad, el epitelio que está por encima del muñón cubriendo la región amputada no posee membrana basal. Esto permite

la comunicación entre el epitelio y el tejido subyacente favoreciendo la regeneración de la extremidad ([Stocum & Dearlove 1972](#)). Este epitelio comienza a engrosarse para dar lugar a una estructura que se conoce como capa del epitelio apical (AEC, por sus siglas en inglés). Esta estructura es muy similar a la de la cresta ectodérmica apical (AER, por sus siglas en inglés) presente durante el desarrollo embrionario de los tetrápodos ([Stocum & Cameron 2011](#)).

Etapa de desdiferenciación

La etapa de desdiferenciación es la fase de la regeneración que precede y permite la formación del blastema y se caracteriza por la liberación de las células de su organización tisular ([Rao et al. 2009](#)). Alrededor de 1-2 μm de los tejidos que subyacen a la epidermis que cubre el muñón experimentan histólisis. Este proceso se lleva a cabo gracias a la presencia de metaloproteinasas y hialuronidasas ácidas ([Stocum & Cameron 2011](#)). La inhibición de las metaloproteinasas durante la regeneración de la extremidad, ocasiona la inhibición de la formación del blastema, favoreciendo la formación de una cicatriz ([Vinarsky et al. 2005](#)).

La etapa de desdiferenciación es una de las etapas más controversiales de la regeneración. Una de las preguntas que se generaron a partir del descubrimiento de la formación del blastema era si las células de esta estructura eran descendientes de células de reserva (troncales), o si derivaban de células maduras. Aunque los primeros estudios llevados a cabo por Thornton en 1938 sugerían que las células del blastema se derivaban de la desdiferenciación de células que, mediante la degradación de la matriz extracelular eran liberadas de su organización tisular ([Thornton 1938](#)), los estudios que mejor demostraron el origen de las células del blastema resultaron de marcar a las células, de tal manera que éstas pudieran monitorearse a través del proceso de regeneración ([Stocum & Cameron 2011](#)). El músculo es uno de los tejidos más empleados como modelo para tratar de dilucidar de dónde provienen las células del blastema. En estudios llevados a cabo por Sandoval-Guzmán *et al.* en el 2014, concluyeron que mientras que en el ajolote son

las células satelitales las que contribuyen a la formación del blastema y por ende, al músculo de la nueva extremidad; en las salamandras son las fibras musculares las que contribuyen a la formación del blastema y por lo tanto, a los músculos de la nueva extremidad ([Sandoval-Guzmán et al. 2014](#)).

Otra conclusión que se obtuvo a raíz de estudios de marcar a las células y seguirlas a lo largo del proceso de regeneración constituyó en que, con excepción de los fibroblastos, que también pueden formar cartílago, las células guardaban una memoria de su origen tisular, pues en la nueva extremidad daban lugar al mismo tipo de tejido del que habían derivado ([Kragl et al. 2009](#)).

Formación del blastema

Una vez que las células han sido liberadas de su organización tisular, éstas se acumulan por debajo del epitelio del muñón. Estas células van a ser las que al proliferar conformarán el blastema. Quien dirige la migración de las células a la parte apical del muñón es la AEC. Se ha observado que si ésta es movida a alguna otra región de la extremidad, las células se acumularán por debajo de la AEC ectópica ([Thornton 1960](#), [Thornton & Thornton 1965](#)).

Durante la etapa de formación del blastema hay una gran cantidad de síntesis de ARN, ADN y proteínas. Sin embargo, al comienzo de la acumulación de células en la parte apical del muñón, la tasa de mitosis es baja. Ésta incrementa bastante una vez que las células han sido acumuladas ([Mescher & Tassava 1975](#), [Tassava & Mescher 1975](#), [Tassava & McCullough 1978](#), [Maden 1978](#)).

Morfogénesis

La morfogénesis representa el producto morfológico de la actividad de la formación de patrones que ha tenido lugar dentro de la regeneración del blastema ([Carlson 2007](#)). Ésta se aprecia, por ejemplo, mediante la condensación de las células que van a formar los moldes de cartílago. Ligeramente posterior a la morfogénesis del

esqueleto, se presenta la morfogénesis del músculo ([Grim & Carlson 1974](#)). Al término de esta etapa, salvo en tamaño, la estructura regenerada es indistinguible de una extremidad no amputada.

Crecimiento

Los organismos que rebasan cierta talla presentan una extremidad más pequeña en proporción con el resto del cuerpo al término de la morfogénesis. En la última etapa de regeneración la extremidad crecerá de tal manera que ésta pueda al final tener el tamaño adecuado a la proporción del cuerpo ([Carlson 2007](#)).

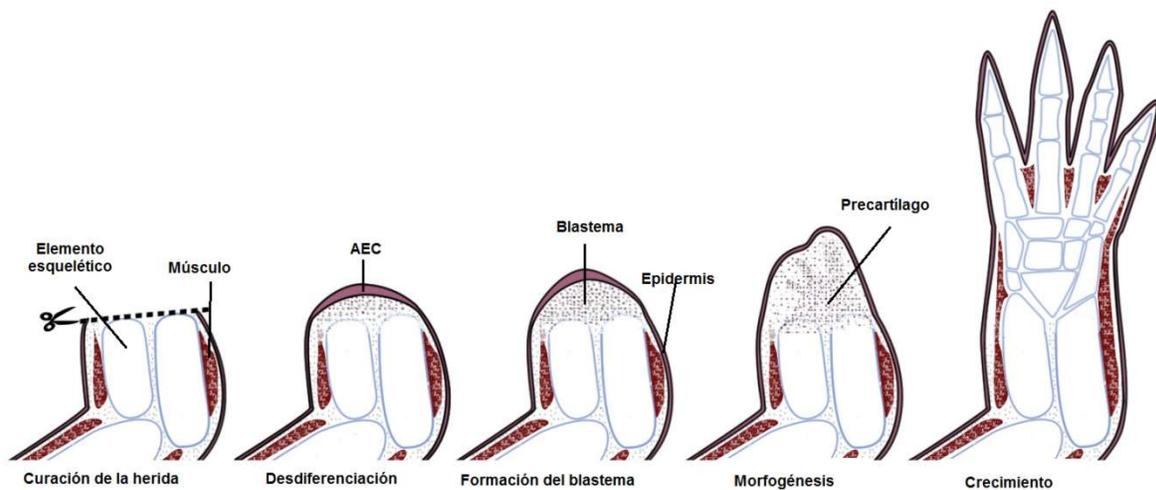


Figura 1.2 Etapas de la regeneración de la extremidad. La regeneración de la extremidad entraña diversos procesos fisiológicos que están interrelacionados y que para facilitar su estudio se dividen en diferentes etapas (Modificado de Carlson 2007).

Características importantes que permiten la regeneración de la extremidad

El epitelio de la herida en la regeneración de la extremidad

El epitelio que cubre al muñón (epidermis de la herida) se considera una de las estructuras esenciales que permiten la regeneración de la extremidad. Si el muñón es cubierto por un injerto de piel engrosada, la regeneración de la extremidad no se lleva a cabo ([Mescher 1976](#), [Tassava & Garling 1979](#)). De igual manera, si el muñón

es introducido en la cavidad corporal inmediatamente posterior a la amputación, resultando en la inhibición de la formación del epitelio de la herida, la regeneración también se ve inhibida ([Goss 1956](#)). Interesantemente, el epitelio de la herida es importante para la regeneración incluso antes de que éste se engrose para convertirse en la AEC. Esto se demostró experimentalmente al permitir únicamente el cierre de la herida por la migración del epitelio, pero previniendo la maduración de la monocapa epitelial, al remover el epitelio de la herida cada 24 horas posteriores a la amputación, durante todo el proceso de regeneración. Por otro lado, en este experimento se emplearon dos especies diferentes de anfibios. Uno que fue incapaz de regenerar y otro que regeneró en el doble de tiempo en la cual se da la regeneración normal. La diferencia entre las dos especies constataba en que el tiempo que requerían para curar la herida era distinto. La especie que no regeneró requería más de 24 horas para una completa curación, mientras que la especie que sí regeneró completaba la formación del epitelio de la herida en aproximadamente 12 horas. Por lo tanto, en este último caso, el epitelio de la herida estaba en contacto con el mesénquima por 12 h cada día, indicando que el epitelio de la herida debe provocar una respuesta regenerativa del tejido mesenquimático del muñón muy brevemente después de su formación ([Thorton 1957](#)).

Se sugiere que la función del epitelio de la herida durante la regeneración consiste en promover la desdiferenciación celular y consecuentemente la proliferación del tejido subyacente ([Yang et al. 1999](#)). Por otro lado, se ha visto que la dermis también juega un papel importante en la regeneración al poseer la información posicional (también el músculo la posee) que va a permitir la adecuada formación de patrones de la extremidad y que también va a permitir la regeneración ([Carlson 1975](#)). Esto último es porque se cree que se requiere que para que haya una inducción de la regeneración, se necesita que al cerrarse la herida la piel que converge debe tener diferentes identidades posicionales. Si la piel que se encuentra tiene la misma identidad posicional (por ejemplo, dos extremos anteriores en vez de uno anterior con uno posterior), la regeneración se trunca ([Tank 1978](#)). Algunos de los experimentos que llevaron a sugerir la relación con la dermis y la información

posicional son los siguientes. Si se rota un anillo de epidermis con parte de la dermis 180° o si se retira la epidermis del anillo y luego se rota la dermis 180° de tal manera que los ejes de la parte interna y la externa de la extremidad queden contraponidos (fig. 1.3 A B y C), y posteriormente se amputa la extremidad en medio del anillo de piel rotado, se obtienen extremidades con multiplicaciones digitales. En cambio, si se gira la epidermis asegurándose que ésta no contenga dermis y posteriormente se amputa la extremidad en medio del anillo rotado, la extremidad regenera de manera normal (Carlson 1975). Sugiriendo que, a diferencia de la epidermis, la dermis posee información que permite la formación de patrones. Por otro lado si se cambia la mitad de la piel (epidermis y dermis) del lado anterior de una extremidad derecha a la mitad posterior de la extremidad izquierda de tal manera que en la extremidad trasplantada tenga dos ejes anteriores, y posteriormente se amputa (fig. 1.3 D y D'), como resultado de la regeneración, se obtienen extremidades a las cuales les faltaban varios elementos, o incluso no regeneran (Carlson 1974, Tank & Holder 1978, Tank 1978), sosteniendo la teoría de que se requiere que al encontrarse la piel, en el proceso de cerrado de la herida, ésta tenga diferentes identidades posicionales.

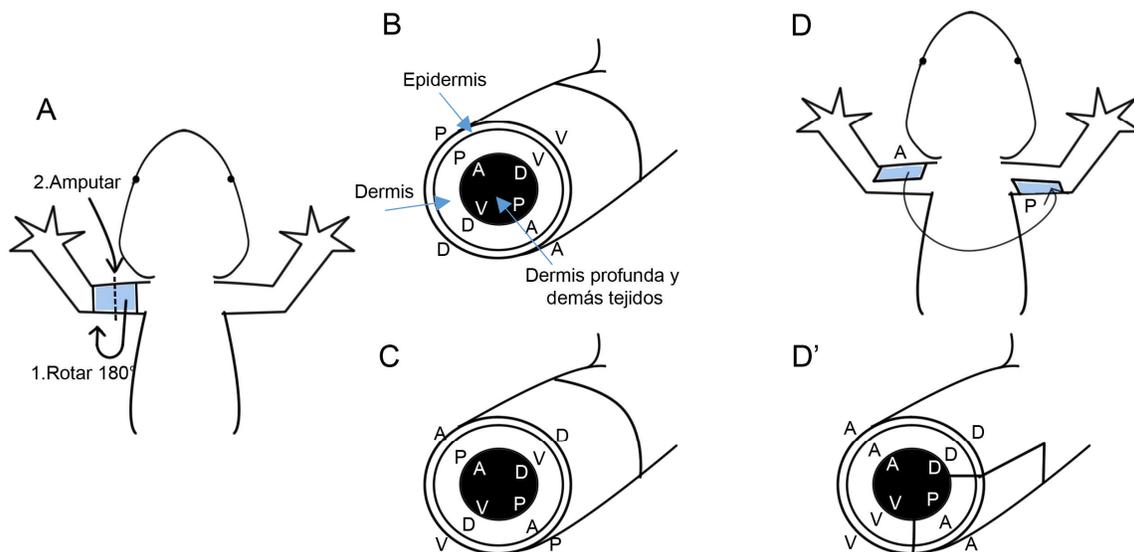


Figura 1.3 Algunos experimentos que sugieren que la dermis tiene la información involucrada en el establecimiento de los patrones de la extremidad. A muestra el anillo de piel que se rota 180 grados. Posteriormente se lleva a cabo el corte de la extremidad, en medio del anillo. **B y C**

muestran en un corte transversal cómo quedarían los ejes de la extremidad con el anillo de piel rotado, **B** cuando se gira la dermis y la epidermis, **C** cuando únicamente está rotada la dermis. En ambos casos la extremidad regenerada resultante posee múltiples dígitos. **D** muestra el esquema del cambio de porción de la piel que se encontraba en la región anterior, a una región posterior de tal manera que como se ilustra en el corte transversal de la extremidad **D'**, se obtienen dos ejes anteriores que al migrar para cerrar la herida tendrán la misma identidad posicional. El resultado de **D-D'** es que la regeneración no se llevará a cabo (modificado de Carlson 1975, Carlson 1974).

El papel de los nervios durante la regeneración de la extremidad

En 1823 Tweedy John Todd describió por primera vez la importancia que tienen los nervios para poder llevar a cabo la regeneración al transectar el nervio de la ciática de la salamandra y posteriormente amputar la extremidad, obteniendo como resultado la completa falta de regeneración ([Carlson 2007](#)).

Singer fue quien describió que era la cantidad de nervios y no el tipo de nervios lo que importaba para poder llevar a cabo la regeneración de la extremidad, además desarrolló una teoría en la cual se menciona que los nervios generan una sustancia trófica que permite que se lleve a cabo la regeneración ([Singer 1952](#)). Congruente con esta idea, posteriormente se descubrió que la denervación conlleva al cese de la división celular, sin importar la etapa de la formación del blastema ([Mescher & Tassava 1975](#)). Hasta la fecha se desconoce cuál es el factor neurotrófico relacionado con la proliferación del blastema, sin embargo existen varios candidatos como son algunos fgfs (fibroblast growth factors), factor del crecimiento glial, transferrina y la proteína nAG (newt anterior gradient) ([Brockes 1984](#), [Mullen et al. 1996](#), [Muniam & Mescher 1986](#), [Kumar & Brockes 2012](#)).

Relación entre el epitelio y los nervios en la regeneración de la extremidad

La denervación de la extremidad a nivel del plexo braquial inhibe la regeneración del miembro debido a que la proliferación del blastema se ve impedida. Dicho proceso está mediado por la interacción entre los nervios y el epitelio de la herida. La proteína “newt anterior gradient” (nAG) es una proteína relacionada con la

regeneración dependiente de nervios. Después de la amputación de la extremidad, la expresión de nAG incrementa en las células de Schwann en la parte distal del muñón. Posteriormente la expresión de nAG se expresa en las células glandulares de la dermis por debajo del epitelio de la herida en el caso del tritón, y en las células glandulares del epitelio (células Leydig) en el ajolote (en este caso se llama aAG). Si la extremidad es denervada previo a la amputación, la expresión de nAG no se da en ninguno de los dos tipos celulares. De manera importante, la expresión ectópica de nAG es capaz de rescatar la regeneración de extremidades denervadas. Además, nAG es capaz de inducir la entrada a fase S del ciclo celular en un cultivo de células de blastema. Se identificó a nAG inicialmente como un ligando de Prod1, una proteína que se expresa en la superficie de las células del blastema que es específica de urodelos ([Kumar et al. 2007](#), [Kumar et al. 2010](#)). Estos experimentos permiten establecer un modelo de interacción entre el epitelio de la herida y los nervios a través de la señal difusora de nAG de los nervios, a las células glandulares y de éstas al blastema.

La vía de señalización Wnt/ β -catenina

La vía de señalización Wnt posee 19 isoformas conocidas para su ligando y diez variantes para su receptor Frizzled. Los Wnts son proteínas secretadas ricas en cisteínas que se modifican mediante N-glicosilaciones y palmitoilaciones. La vía de señalización Wnt tiene diferentes vías de transducción. La más conocida es la vía canónica, dependiente de β -catenina. Cuando el ligando Wnt no está unido a su receptor, β -catenina es degradada por un complejo multiprotéico que está conformado por una proteína de anclaje llamada axina, la enzima glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK-3 β) (cuya función es marcar, mediante fosforilación, a las β -cateninas para su ubiquitinación y rápida degradación mediante proteasomas), una proteína supresora de tumores llamada poliposis coli adenomatosa (APC) (que une a β -catenina fosforilada y la transfiere a β -TrCP (Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase) para su ubiquitinación) y la enzima caseína cinasa 1 α (CK1 α) (que, junto con GSK-3 β , median la fosforilación de residuos amino terminal

de β -catenina). La vía de señalización de Wnt/ β -catenina se activa al unirse el ligando al receptor Frizzled y al correceptor de lipoproteínas de baja densidad LRP5 o LRP6. Esto favorece el reclutamiento de la proteína Dishevelled (Dvl) que, posteriormente, es fosforilada. La activación de la proteína Dvl recluta a su vez a proteínas del complejo de degradación provocando el desensamble del complejo, favoreciendo de esta manera la acumulación de β -catenina en el citoplasma, para que posteriormente pueda traslocarse al núcleo, desplazar al inhibidor de transcripción Groucho y unirse a los factores de transcripción TCF/LEF (factor de células T/factor estimulador linfoide) (Yang 2003, Yang 2012, Nusse 2012).

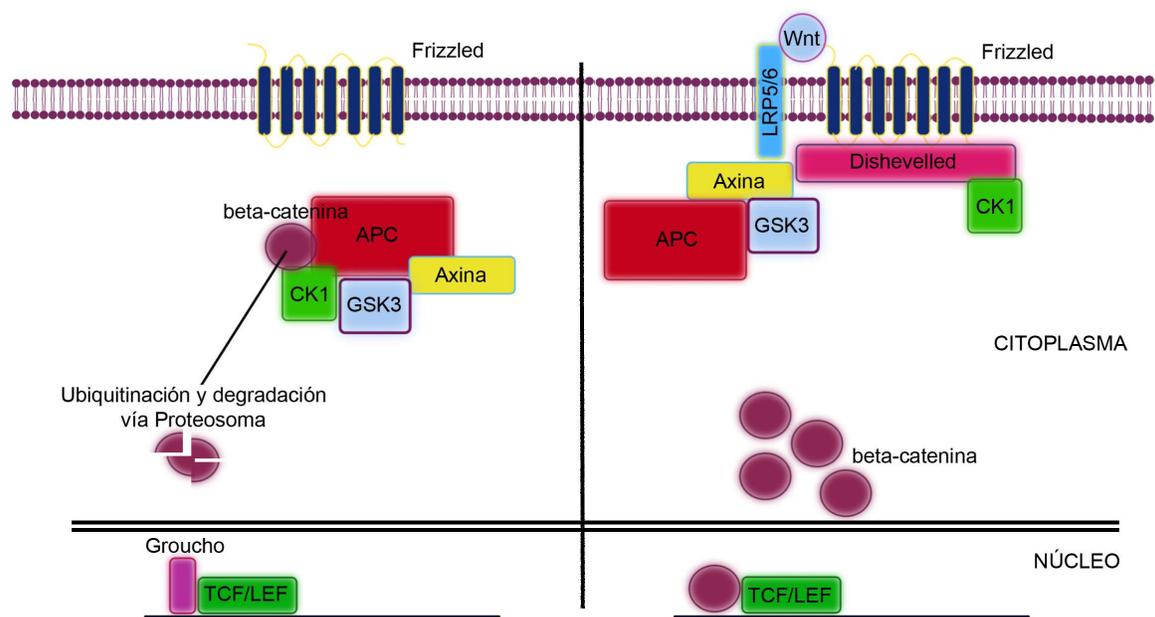


Figura 1.4 Vía de señalización de Wnt/ β -catenina. El esquema del lado izquierdo muestra la vía de señalización inactiva, debido a la ausencia del ligando. La del lado derecho muestra la vía de señalización activa debido a la presencia del ligando Wnt (modificado de Yang 2003).

El papel de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante el desarrollo embrionario de la extremidad

La regeneración de la extremidad se reconoce como un proceso que comparte muchas características con el desarrollo de la extremidad. La vía de señalización

Wnt/ β -catenina tiene papeles críticos de manera temporal y tejido-específica a lo largo del desarrollo de ésta y por lo tanto está involucrada en la iniciación de su formación, en su crecimiento, en el establecimiento de patrones y en la morfogénesis de los tejidos ([Chen et al. 1998](#), [Akiyama et al. 2002](#), [Takeuchi et al. 2003](#), [Hill et al. 2006](#), [Tanaka 2013](#)).

Señalización Wnt/ β -catenina en la iniciación del desarrollo embrionario de la extremidad

Las extremidades provienen de la placa del mesodermo lateral y aparecen como protrusiones en los costados del embrión. Al comienzo de su desarrollo, los primordios de la extremidad se forman como resultado de un asa de retroalimentación entre Fgf y la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. En pollo Wnt2b se expresa en el mesodermo de la región que presuntamente formará la extremidad anterior y Wnt8c en la que formará la extremidad posterior ([Tanaka 2013](#)). Ambos ligandos actúan a través de la vía de señalización dependiente de β -catenina para mantener la expresión de Fgf10, también en el mesodermo. La inhibición de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina causa una disminución en la expresión de *Fgf10*, no así de *Tbx5*, un factor de transcripción involucrado en la formación de las extremidades anteriores que, al ser expresado de manera ectópica en las extremidades posteriores, es capaz de inducir la formación de éstas con identidad de extremidades anteriores. *Tbx5* parece actuar río arriba en la cascada de señalización de β -catenina y Fgf pues la expresión de un dominante negativo de *Tbx5* suprime la expresión de *Wnt2b*, *Fgf8* y *Fgf10* ([Takeuchi et al. 2003](#), [Hill et al. 2006](#)). De manera interesante, la colocación de células que expresan *Wnt2b* en un costado del embrión es capaz de generar extremidades ectópicas ([Kawakami et al. 2001](#)).

Señalización Wnt/ β -catenina en el crecimiento de la extremidad durante el desarrollo embrionario

Cuando se forma el primordio de la extremidad, la unión entre el ectodermo ventral y dorsal de la extremidad se engrosa para formar la cresta ectodérmica apical (AER), una estructura esencial para el desarrollo de la extremidad. Como consecuencia de la inducción de Fgf10 desde el mesodermo, esta estructura expresa Wnt3 en el ratón y Wnt3a en el pollo y a través de la vía de Wnt/ β -catenina regula la expresión de Fgf8, que a su vez regula la expresión de Fgf10, formando de esta manera un asa de retroalimentación que permite el crecimiento de la extremidad. Se requiere de una regulación adecuada de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina para mantener la integridad de la AER pues, tanto la sobreactivación como la inhibición de la actividad de esta vía de señalización afectan a la AER, alterando por lo tanto el desarrollo de la extremidad ([Barrow et al. 2003](#), [Hill et al. 2006](#)).

Señalización Wnt/ β -catenina durante la formación de patrones en el desarrollo embrionario de la extremidad

Los 3 ejes de la extremidad son el antero-posterior (A-P), el proximo-distal (P-D) y el dorso-ventral (D-V). La vía de señalización Wnt/ β -catenina está involucrada en el desarrollo del patrón D-V. Wnt7a se expresa en el ectodermo dorsal de la extremidad y regula la expresión de *Lmx1b* en el mesodermo dorsal. Ratones deficientes tanto para Wnt7a como *Lmx1b* presentan dorsalización de la extremidad ([Parr & McMahon 1995](#), [Chen et al. 1998](#)).

Señalización Wnt/ β -catenina durante la morfogénesis en el desarrollo embrionario de la extremidad

La vía de señalización Wnt/ β -catenina controla la morfogénesis de varios tejidos en la extremidad como son músculos, articulaciones, cartílago y hueso.

Durante la formación del músculo, Wnt3a regula los precursores miogénicos al regular la expresión de Pax3 ([Munsterberg et al. 1995](#)) y la inhibición de la vía

reduce el número de miocitos en el primordio de la extremidad de pollo ([Anakwe et al. 2003](#)).

Durante el desarrollo del esqueleto la vía de señalización Wnt/ β -catenina también es muy importante. La actividad de la vía suprime la diferenciación de condrocitos regulando de manera negativa la expresión de Sox9, uno de los primeros marcadores condrogénicos conocidos ([Akiyama et al. 2002](#), [Chimal-Monroy et al. 2003](#), [Akiyama et al. 2004](#), [ten Berge et al. 2008](#)).

El papel de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la formación de las articulaciones es controversial. Por un lado, la sobreactivación de Wnt9a o β -catenina durante la diferenciación temprana de los condrocitos causa formación ectópica de las articulaciones ([Guo et al. 2004](#)); sin embargo en el trabajo de Später se sugiere que la vía no es necesaria para la inducción de la formación de las articulaciones, sino más bien para su mantenimiento ([Später et al. 2006](#)). Por otro lado, un ratón mutante que expresa una forma constitutivamente activa de LEF bajo el promotor de la colágena 2A1 presenta elementos esqueléticos fusionados y articulaciones pobremente formadas ([Tamamura et al. 2005](#)).

El papel de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la regeneración de la extremidad en Pez cebra y *Xenopus*

Pez cebra

En el laboratorio de Randall T. Moon se vio que al inhibir la vía de señalización Wnt/ β -catenina mediante mutantes que expresaban condicionalmente Dickkopf-1 (Dkk1), un inhibidor de la vía que impide la interacción entre el receptor Frizzled y el correceptor LRP 5/6, o mediante la expresión de un dominante negativo para TCF, un factor de transcripción de la vía Wnt/ β -catenina, los peces no eran capaces de regenerar la aleta. Por otro lado, al activar la vía mediante peces que eran heterócigos para una forma no funcional de axina1, un regulador negativo de la vía

Wnt/ β -catenina, la regeneración ocurría más rápido que en un control. Además, se vio que la sobreexpresión de Wnt8 incrementa la proliferación celular tanto del epitelio, como de las células mesenquimales del blastema, aunque esta sobreexpresión no incrementó la tasa de regeneración. Consistente con esto, la sobreexpresión de Dkk1 decrementó la proliferación en estos mismos tejidos. Los autores sugirieron que la vía no canónica de Wnt parece tener un efecto contrario al de la vía canónica pues, la sobre activación de Wnt5b, un ligando que activa vías no canónicas, inhibe la regeneración y disminuye la proliferación celular. Además, una línea mutante conocida como *piperal*, la cual tiene una pérdida de función de Wnt5b, es capaz de aumentar la tasa de regeneración ([Stoick-Cooper et al. 2007](#)). Todo esto nos sugiere que la vía de señalización de Wnt/ β -catenina tiene un papel importante en la proliferación celular. Sorprendentemente la vía de señalización Wnt/ β -catenina no está activa en zonas de alta proliferación. Mediante un reportero transgénico dependiente de la transcripción de β -catenina, se estableció que la vía de señalización está activa únicamente en distintas subregiones del blastema durante la regeneración, importantemente no se detectó actividad de esta vía en la epidermis. Estas subregiones en las que está activa la vía son la zona más distal del blastema (una región que no es proliferativa) y una región donde se expresa *and1* y *runx2*, un marcador para células que forman actinotrichia y un marcador para progenitores osteoblásticos, respectivamente. Mientras que, por otro lado, ni la zona de blastema de alta proliferación ni los osteoblastos comprometidos presentaron actividad ([Wehner et al. 2014](#)).

En este mismo artículo señalan que el hecho de que la vía de señalización Wnt/ β -catenina esté involucrada en la proliferación, pero a su vez esté activa en regiones no proliferativas, sugiere que la vía de señalización Wnt/ β -catenina regula la proliferación de manera indirecta, posiblemente a través de Sonic hedgehog (Shh) y de ácido retinoico (AR). Ya que SAG, el agonista de smoothened (receptor que forma parte de la vía de Shh), es capaz de rescatar la proliferación en aletas que tienen la vía de Wnt/ β -catenina inhibida. Por otro lado, mutantes condicionales que sobre expresan Wnt8 no son capaces de rescatar la inhibición de la proliferación producida por la ciclopamina (un fármaco inhibidor de la vía de Shh), sugiriendo que

la vía Wnt está por encima de la de Shh en el pez cebra. Igualmente, la aplicación de AR es capaz de rescatar la proliferación en peces que tienen la vía Wnt/ β -catenina inhibida.

Además de regular la proliferación, en este artículo se vio que la inhibición de Wnt/ β -catenina afecta la osteogénesis. Ya que un mutante que tiene inhibida la vía específicamente en las células que forman actinotriquia presenta una reducción en la calcificación ósea además de un decremento en la expresión de *Sp7*, un marcador para osteoblastos comprometidos.

Todo esto sugiere que en la regeneración del pez cebra las regiones que tienen activa la vía de señalización de Wnt/ β -catenina son centros organizadores que orquestan de manera indirecta tanto la proliferación como la diferenciación de los osteoblastos ([Wehner et al. 2014](#)).

Xenopus

Kawakami *et al.* inyectaron un adenovirus que expresaba Dkk1 en extremidades de larvas de *Xenopus* amputadas en el estadio 51, inhibiendo de este modo, la vía de señalización de Wnt/ β -catenina y encontraron que en estas condiciones la regeneración se inhibe o se reduce.

Por otro lado, la inyección de un adenovirus que expresa β -catenina activa en larvas de *Xenopus* en estadios en los que la capacidad de regeneración comienza a declinar (53-54) permitió que un 6.7% de las ranas inyectadas regenerara de manera normal y un 21.5% presentara una regeneración reducida en comparación con un 100% de inhibición de regeneración en los animales no inyectados. Sin embargo, en el estadio 58 cuando la capacidad de regeneración se perdió completamente, β -catenina activa no fue capaz de rescatar dicha incapacidad ([Kawakami et al. 2006](#)).

Yokoyama *et al.* sugirieron que la afectación en la regeneración causada por la inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina era mucho más drástica en etapas tempranas de la regeneración de la extremidad de larvas de *Xenopus*. Esto

lo observaron al inducir la inhibición de la vía de manera condicional, mediante la generación de ranas transgénicas que expresan Dkk1 bajo un promotor de choque térmico. Lo que ellos observaron fue que al inducir la expresión de Dkk1 antes o durante la formación del blastema se bloqueaba la regeneración de la extremidad, sin afectar el desarrollo de la extremidad contralateral. Sin embargo, si la expresión de Dkk1 era posterior a la formación del blastema, las ranas conservaban la capacidad para regenerar de manera parcial ([Yokoyama et al. 2007](#)).

Como se describió en la introducción, las ranas *Xenopus* tienen dos estadios en los cuales ésta es capaz de regenerar. A pesar de que se demostró que en las larvas la vía de señalización Wnt/ β -catenina es esencial para regenerar, éste no parece ser el caso para las ranas *froglets*. Al inhibir la vía de señalización de Wnt/ β -catenina mediante la sobreexpresión de Dkk1, las ranas *froglets* son capaces de formar un *spike* al igual que los controles. Mientras que como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de Dkk en los renacuajos inhibe la regeneración.

La diferencia de la respuesta ante la inhibición de la vía parece recaer en los nervios. Las extremidades de los renacuajos no están altamente inervadas mientras que las de las *froglets* sí. Al denervar la extremidad de estas últimas la regeneración se ve inhibida. Sin embargo, si a esta extremidad denervada se le aplica BIO inhibidor de GSK3 y por lo tanto, un activador de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la regeneración se rescata, sugiriendo que los nervios y la vía de señalización de Wnt/ β -catenina tienen papeles redundantes durante la regeneración de la extremidad de los *froglets* ([Yokoyama et al. 2011](#)).

La vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la regeneración de la extremidad en Urodelos

Durante la regeneración de la extremidad del ajolote adulto la inhibición de Wnt/ β -catenina mediante la inyección de un vector adenoviral diseñado para expresar Axina1 (un inhibidor intracelular de la vía), afecta el proceso de regeneración de tal

modo que no forma una extremidad completa. Por el contrario, se regenera un único elemento espigado que no posee dígitos y termina en punta en un 60% de las extremidades inyectadas. Por otro lado, si se inyecta un adenovirus que exprese Dkk1, un inhibidor extracelular de la vía en larvas de ajolote, la inhibición de la regeneración es completa en 7% y reducida en 19% de las extremidades inyectadas, mientras que el resto regenera de manera normal ([Kawakami et al. 2006](#)). Esto sugiere que también durante la regeneración de los urodelos la vía de señalización Wnt/ β -catenina es necesaria para poder llevar a cabo la regeneración de la extremidad de manera adecuada.

En el tritón se ha visto que la inhibición de la vía de señalización de hedgehog (Hh) inhibe la proliferación celular. El porcentaje de proliferación puede ser rescatado, sin embargo, si además se tratan a los animales con BIO, un activador de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Esto sugiere que a diferencia del pez cebra, en el tritón la vía de Wnt/ β -catenina está río abajo de la vía de Hh. Asimismo, la aplicación de ciclopamina en tejido de extremidad en regeneración, reduce los niveles de expresión de Wnt3a ([Singh et al. 2012](#)).

JUSTIFICACIÓN

Existen muy pocos animales que poseen la capacidad de regenerar sus extremidades, sin embargo, los ajolotes son los que lo hacen con mayor precisión. Aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares que permiten que este fenómeno se lleve a cabo. Se sospecha que existe una relación entre los eventos que permiten el desarrollo de la extremidad y los que permiten la regeneración de la extremidad.

Durante el desarrollo de la extremidad, la vía de señalización Wnt/ β -catenina está involucrada en la iniciación de la formación de la extremidad, el crecimiento, formación de patrones y morfogénesis. A pesar de que se ha demostrado que la ausencia de la vía de señalización durante el proceso de desarrollo de la extremidad causa el truncamiento de su formación, la estabilización de β -catenina al comienzo del desarrollo de la extremidad también resulta en el truncamiento de la extremidad y en una regresión temprana de la AER, mientras que la actividad ectópica de la vía de señalización en estadios más tardíos resulta en anomalías esqueléticas. Esto demuestra que se requiere de una fina orquestación de la vía de señalización a lo largo del proceso, para poder llevar a cabo la adecuada formación de la extremidad y que el efecto de la desregulación es dependiente de la etapa en la que se encuentra el desarrollo de ésta.

Anteriormente se ha evaluado el efecto de inhibir la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la regeneración de la extremidad, teniendo como resultado la inhibición de dicho proceso, mostrando de esta manera que esa vía de alguna manera es importante para poder llevar a cabo la regeneración. En organismos como el pez cebra se probó que la vía de señalización estaba implicada en la proliferación celular y que su activación era capaz de incrementar la tasa de regeneración. Sin embargo, hasta ahora no se ha probado el efecto que tiene el sobreactivar la vía de señalización Wnt/ β -catenina en el proceso de regeneración de los urodelos. Por otro lado, debido a que, como se mencionó anteriormente, la regeneración entraña

diversos eventos fisiológicos a lo largo del proceso, tampoco se ha probado si el efecto es distinto dependiendo de la etapa de regeneración.

Por otro lado, entender los mecanismos moleculares que afectan la regeneración nos acercaría a aclarar el complicado proceso que entraña este fenómeno y podría ayudarnos a explicar a la larga, por qué animales como los urodelos son capaces de restablecer sus miembros mientras que los humanos no.

HIPOTESIS

El efecto que causa el activar la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes momentos a lo largo del proceso de regeneración de la extremidad del ajolote será diferente de acuerdo con la etapa en la que se haya dado el estímulo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de activar la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes momentos a lo largo del proceso de regeneración de la extremidad del ajolote.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la localización de la actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes momentos a lo largo del proceso de regeneración de la extremidad del ajolote.

Comprobar la activación de la vía Wnt/ β -catenina por el fármaco agonista de Wnt.

Activar la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes ventanas de tiempo a lo largo del proceso de regeneración y evaluar el fenotipo final.

Evaluar mediante un análisis temporal la progresión en la regeneración al activar la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la ventana de tiempo de 24 horas post amputación.

Investigar si se ve afectada la innervación en animales tratados con el agonista de Wnt en la ventana de tiempo de 24 horas post amputación.

Probar el efecto de activar la vía de señalización Wnt/ β -catenina (a través del agonista de Wnt) sobre la proliferación celular en la etapa de formación del blastema.

Evaluar histológicamente la apariencia de extremidades tratadas con el agonista de Wnt en la etapa posterior a la formación del blastema, previo a la morfogénesis.

Evaluar la expresión de *sox9*, un marcador de condrogénesis, en extremidades regenerantes de animales tratados con el agonista de Wnt en la etapa posterior a la formación del blastema, previo a la morfogénesis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y mantenimiento de los ajolotes

Los ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) fueron obtenidos ya sea como larvas o como huevos del laboratorio de Restauración Ecológica de la Dra. Cecilia Vanegas en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); del M en C. Felipe Correa Sánchez del Laboratorio de Herpetología de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM; del MVZ. M en C. Horacio Mena González y el Dr. Luis Zambrano del Instituto de Biología, UNAM; de Fernando Arana del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas en Cuernavaca (CIBAC) y de Enrique Godínez de PETMMAL. Estos fueron colocados en recipientes con agua de la llave filtrada. Los ajolotes en edades de recién eclosionados a un mes fueron alimentados con artemia (*Artemia sp.*) recién eclosionada.

Los animales con más de un mes de edad se alimentaron con artemia adulta. Una vez que los animales alcanzaron una talla de 3-4 cm, fueron separados del resto de los ajolotes para ser colocados en recipientes individuales con la finalidad de que pudieran regenerar las extremidades en caso de que los otros ajolotes se las hubieran comido o para evitar que esto sucediera y por lo tanto, para que al alcanzar la talla de 5-6 cm las extremidades pudieran estar disponibles y completas para proceder a los experimentos.

Eclosión de quistes de artemia

Para eclosionar los quistes de artemia, se preparó una solución *stock* de 600 g de NaCl y 6 g de NaHCO₃ en 1500 ml de agua purificada mediante el sistema Milli-Q® que posteriormente fue aforada a 2000 ml (Concentración final aproximada de 20.5 M de NaCl y 0.14 M de NaHCO₃). De esta solución *stock* se tomaron 170 ml y se mezclaron con 1530 ml de agua desionizada por cada 6.75 gr de quistes. Los quistes fueron mantenidos en luz y aireación constante en un dispositivo especial para eclosionar artemia que puede ser elaborado con una botella de refresco de 1.5-2 L.

Cirugías

Amputación

Los ajolotes de 5-6.5 cm de talla de cabeza a cola se anestesiaron con Tricaína (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 0.05% y posteriormente se colocaron en una caja Petri bajo un microscopio de disección. Se amputaron una o ambas extremidades anteriores a mitad del zeugópodo con un cortaúñas o con una navaja de disección. Posterior a la operación, los animales se regresaron al agua de la llave filtrada.

Al final de cada experimento en cuestión, se colectaron las extremidades anteriores. Esto se refiere a que fueron cortadas en la base, a nivel del hombro y posteriormente tratadas de distintas maneras acorde con el experimento deseado.

Denervación

Los ajolotes de 5-6.5 cm de talla de cabeza a cola se anestesiaron con Tricaína y posteriormente se les colocó de costado en una caja Petri de tal manera que la extremidad quedara en el cenit, la cabeza apuntando a la derecha y la cola a la izquierda. Se humedecieron en tricaína trozos de papel con los que se cubrieron los ajolotes, dejando expuesta una franja que abarcara el hombro y el brazo (fig. 3.1 A). Se movieron de lugar las branquias (flecha blanca en fig. 3.1 B) de tal manera que el hombro y todo el brazo del ajolote quedaran visibles. En caso de que las branquias no se lograsen retener en una posición en la cual dejara visible la zona a operar, se colocó un pedazo de sanita humedecida sobre la branquia una vez puesta en una posición adecuada. Se realizó un pequeño hoyo en la epidermis con las microtijeras de cirugía, ligeramente abajo y posterior al hombro. El tejido por debajo de la piel se seccionó hasta llegar a un vaso sanguíneo con forma de "Y" (fig. 3.1 B). Los 3 nervios braquiales (de color crema) que se ubican posterior al vaso sanguíneo en forma de "Y" fueron seccionados. Las capas de los tejidos que se retiraron fueron colocadas nuevamente en su lugar. Posteriormente los animales se

taparon completamente con una sanita humedecida por un plazo de media hora para finalmente ser regresados a su recipiente con agua de la llave filtrada.

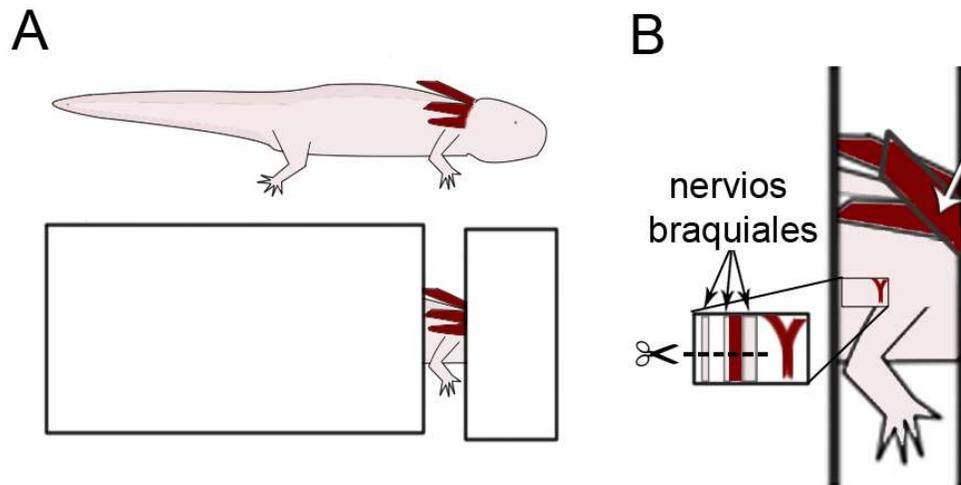


Figura 3.1 Preparación del ajolote para denervar. El ajolote anestesiado es colocado de costado de tal manera que la cabeza quede de lado derecho y la cola del lado izquierdo. Posteriormente es cubierto con retazos de sanitas humedecidas en Tricaína dejando expuesta la región de la extremidad (A). Las branquias son acomodadas para poder exponer la parte posterior del hombro (flecha blanca). Los tres nervios braquiales se ubican posterior a una rama de una vena en forma de “Y” y los dos nervios principales flanquean una vena. Para denervar la extremidad los 3 nervios son seccionados con cuidado de no cortar los vasos sanguíneos (B).

Tratamiento con el fármaco agonista de Wnt

El agonista de Wnt (2-Amino-4-(3,4-(methylenedioxy)benzylamino)-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidine) de Calbiochem (Billerica, MA, USA) fue inicialmente diluido a una concentración de 50 mM en DMSO. Posteriormente éste se diluyó en agua de la llave filtrada a una concentración de 1 μ M (aproximadamente en un volumen final de 100 ml de agua) y el ajolote se colocó ahí en diferentes días post amputación dependiendo del experimento que se llevó a cabo. El fármaco se recambió regularmente si el experimento excedía los 2 días de duración. Los animales que se emplearon como controles se trataron con dimetil sulfóxido (DMSO).

Con la finalidad de visualizar el efecto local del agonista de Wnt en las células mesenquimales, se embebieron perlas de intercambio iónico AGI-X2 (Sigma-Aldrich) en 10 mM del agonista de Wnt e implantadas con la ayuda de una aguja de tungsteno dentro del blastema de la extremidad en regeneración.

Tinción de esqueleto

Las extremidades colectadas para tinción de esqueleto se fijaron toda la noche en etanol al 95% y se permeabilizaron en acetona. Posteriormente, las extremidades colectadas se tiñeron en Azul Alciano/Rojo de Alizarina por tres días. Al finalizar el periodo de tiempo adecuado, los esqueletos se aclararon en 1% KOH/20% glicerol y se almacenaron en etanol, glicerol 1:1.

Tinción de Tricrómica de Masson

Esta tinción se llevó a cabo en extremidades fijadas en paraformaldehído al 4% a 4°C toda la noche, que posteriormente fueron embebidas en paraplast de acuerdo a las técnicas convencionales. Los cortes histológicos de un grosor de 7 µm fueron teñidos también de acuerdo a las técnicas convencionales de Tricrómica de Masson.

Esta tinción se utiliza para evidenciar fibras de colágena. La técnica tricrómica de Masson es una tinción diferencial y policrómica. En todos los métodos tricrómicos, se utilizan 3 colorantes:

- Un colorante nuclear, normalmente hematoxilina
- Un colorante citoplásmico, orange G, ponceau de xilidina, escarlata de Biebrich, azofloxina etc.
- Un colorante del conjuntivo (para las fibras de colágena). Estos colorantes suelen ser derivados del anillo de trifenilmetano.

El procedimiento para llevar a cabo la tinción que se empleó en este trabajo, se puede encontrar descrito en la página: http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/masson_trichrome.htm.

Inmunohistoquímicas

Se emplearon los siguientes anticuerpos: β -catenin activa (05-665, Millipore, Billerica, MA, USA) 1:200; tubulina acetilada (T7451, Sigma-Aldrich) 1:400; fosfo-histona H3 (06-570, Millipore) 1:250; 1:100; Cy3 anti-conejo (111-16544, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Sacramento, CA, USA) 1:500; y alexa 555 anti-ratón (A21426, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1:500 y alexa488 anti-conejo (a21206, Invitrogen) 1:500. Las inmunofluorescencias se analizaron con el sistema Fluoview FV1000 del microscopio confocal (Olympus) añadido en interfase con el microscopio de luz invertido Olympus IX81, con un objetivo de inmersión en glicerol 20x. Las inmunofluorescencias contra β -catenina activa se llevaron a cabo en cortes de 40 μm en el criostato. Para ello, las extremidades, una vez colectadas, se colocaron en PFA a 4°C toda la noche, para posteriormente pasarlas por sacarosa al 10% por 24 horas, sacarosa al 20% por 24 horas y finalmente sacarosa al 30% por 24 horas. Concluido este periodo de tiempo, las extremidades se embebieron y montaron en Tissue Tek para posteriormente poder ser seccionadas en el criostato. Las inmunofluorescencias contra tubulina acetilada y contra fosfo-histona H3 se llevaron a cabo en tejidos embebidos en paraplast (Sigma-Aldrich) de un grosor de 10 μm y 7 μm respectivamente. Para ello, una vez colectadas las extremidades, éstas se colocaron en PFA a 4°C toda la noche, para posteriormente pasarlas por un tren de deshidratación en alcohol. Al finalizar el tren, las extremidades se colocaron en Xilol hasta aclarar, se pusieron en paraplast/xilol 1:1 toda la noche, en paraplast dos veces una hora y finalmente se montaron para poder ser procesadas posteriormente.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo con la técnica de Trizol (Invitrogen). Para ello se añadió 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido. Posteriormente se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos al final de lo cual se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de trizol utilizado. La muestra se agitó en un vortex y se incubó por un periodo de 2-3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadieron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de trizol utilizado. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de trizol utilizado y posteriormente se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 100 µl de agua libre de RNAsas.

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el sistema M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Para ello se añadió 1 µg de ARN, 1 µl de oligonucleótido antisentido 5 µM (oligo dT), 1 µl de dNTP's 10 µM, 8 µl de amortiguador RT 5x, 1 µl de inhibidor de RNasa, 1 µl de enzima M-MLV RT *Promega* y lo restante de agua para obtener un volumen final de 40 µl. La muestra se incubó a 42°C por 60 minutos y posteriormente a 70°C por 15 minutos.

RT-PCR

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo usando RNA colectado de 8 pieles de extremidades de ajolotes de 12 días post amputación tratados con el agonista de Wnt o con DMSO. Los oligos que se emplearon fueron los siguientes:

c-myc oligo forward 5'-TGACCCTTCAGTGGTCTTCC-3'

c-myc oligo reverse 5'-CGCCTCTTGTCGTTCTCTTC-3'

axina2 oligo forward 5'-GAGTCTGACGCTTGGACACT-3'

axina2 oligo reverse 5'-AGAAACTCGGTGAGTGGCATT-3'

Las condiciones para Ef1 α se obtuvieron de Satoh *et al.* 2007 ([Satoh et al. 2007](#)). *c-myc* y *axina2* se amplificaron a 35 ciclos. Se llevó a cabo una electroforesis de las muestras y posteriormente se le tomó una fotografía al gel resultante, para ser analizado en el programa Image J. Con los datos obtenidos en el programa se llevó a cabo un análisis estadístico de t de Student con la finalidad de establecer la diferencia estadística de la expresión de *c-myc* y *axina2* en las extremidades controles versus las tratadas con el agonista de Wnt.

Cultivo celular

Las células RKO (carcinoma de colon humano) se obtuvieron de the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células RKO se mantuvieron en el medio Dulbecco Eagle modificado suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), antibiótico (120 mg/ml de penicilina y 200 mg/ml de estreptomina) y 2 mM de L-glutamina. Las células se cultivaron en una incubadora con humedad a 37°C con 5% de CO₂.

Transfección y ensayo de reportero de luciferasa

La transfección se llevó a cabo con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se sembraron en cajas de 24 pozos en una concentración de 3.5×10^5 células por pozo. 24 horas después de haber sido sembradas, las células se colocaron en medio libre de suero y se transfectaron transitoriamente con 0.7 μ g del plásmido reportero (pTOPFlash) o con el plásmido control (pFOPFlash) más 0.05 μ g del plásmido de luciferasa pRL (control de transfección). El reportero de luciferasa se midió 24 horas

posteriores a la transfección en lisado celular usando el kit del ensayo de luciferasa dual (Promega, Madison, WI). La actividad se normalizó con respecto a la actividad de luciferasa de renilla ([Luna-Olloa et al. 2011](#)).

Índice mitótico

Para medir la proliferación celular, se contaron un total de 300 células en el blastema y un total de 150 células en el epitelio en 4 diferentes cortes de la misma extremidad, haciendo un total de 1200 células para el blastema y 600 células para el epitelio de cada extremidad de cada animal. Se emplearon 4 animales (por lo tanto, 4 extremidades) para cada grupo. Dentro de las células contabilizadas, también se contaron las células con una marca positiva para fosfo-histona H3. Se obtuvo el índice mitótico para el epitelio y para el blastema de cada grupo al dividir el número de células positivas a fosfo-histona H3 entre el total del número de células contabilizadas

Hibridación *in situ* en cortes

Para la hibridación *in situ* en cortes (7 μ m) de tejidos embebidos en paraplast (Sigma-Aldrich), la sonda empleada (*sox9*) se obtuvo como se describe en Guimond *et al.* 2010 y las hibridaciones para los cortes del tejido se llevaron a cabo de acuerdo con Garcíadiego-Cázares *et al.* 2004.

RESULTADOS

Durante el proceso de regeneración de la extremidad del ajolote la actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina se localiza en las células de Leydig

Con la finalidad de dilucidar en qué región de la extremidad estaba activa la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, se llevó a cabo una inmunofluorescencia con un anticuerpo contra β -catenina activa (ABC beta-cat). Dicho anticuerpo, como su nombre lo indica, reconoce la forma activa de la proteína al unirse a la forma defosforilada de Ser37 o la Thr41. La β -catenina, al no estar presente el estímulo del ligando Wnt, es fosforilada en los residuos de Ser37 y Thr41, lo que ocasiona su posterior degradación ([Lee et al. 2009](#)). Al estar presente el ligando, se impide dicha fosforilación, lo cual evita que se degrade, permitiendo que se acumule en el citoplasma para posteriormente traslocarse al núcleo, por lo que una marca de un anticuerpo contra β -catenina localizada en el núcleo es un buen indicativo de que la vía de señalización Wnt/ β -catenina se encuentra activa.

Para establecer cómo variaba la actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina a lo largo del tiempo, se realizaron cortes histológicos de extremidades de 1, 5, 7, 10, 12 y 15 días post amputación (dpa) y se llevó a cabo la inmunofluorescencia contra β -catenina activa.

La epidermis de la piel de los ajolotes consiste de tres diferentes tipos de células: células epidermales no queratinizadas, células basales epidermales y células de Leydig. Estas células (descritas por Leydig en 1857) son células glandulares redondas considerablemente más largas que las células epidermales que las rodean. Cuando no están totalmente maduras, las células de Leydig poseen vacuolas que son posteriormente reemplazadas por pequeños gránulos ([Hay 1961](#), [Jarial 1989](#), [Gerling et al. 2012](#)).

En las figuras 4.1 y 4.2 se muestra la inmunofluorescencia con el anticuerpo contra β -catenina activa y la co-localización con el marcador nuclear DAPI. En la figura 4.1 se muestra la marca del anticuerpo en el epitelio de una de las extremidades en regeneración, mientras que en la figura 4.2 se muestra la marca del anticuerpo para

la parte distal de la extremidad amputada, presentada en diferentes momentos a lo largo del proceso de regeneración. También se incluye un acercamiento de una región de la extremidad en los diferentes días post amputación. Además, se muestra una inmunofluorescencia control llevada a cabo únicamente con el anticuerpo secundario en un corte de una extremidad de 15 dpa.

Como se puede observar en la figura 4.2, la inmunofluorescencia muestra la marca del anticuerpo co-localizando con la del marcador nuclear DAPI en las células de Leydig del epitelio de la extremidad a lo largo de todo el proceso de regeneración, tanto en el epitelio de la extremidad de la región que está regenerando, como en la región no regenerante. La marca no se observa co-localizando en el núcleo de otras células.

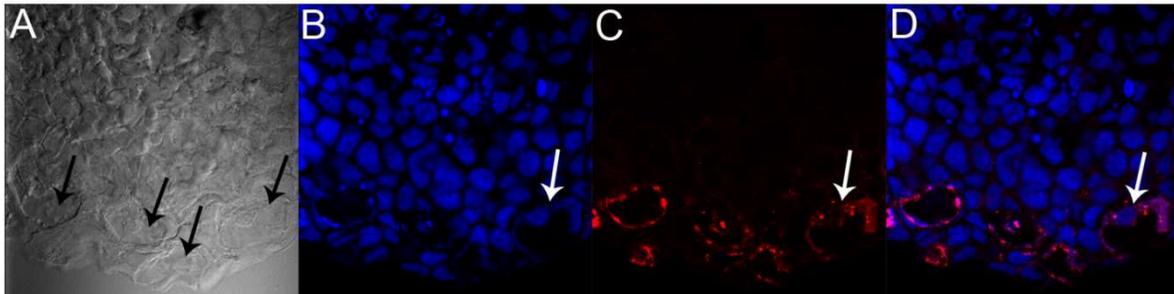


Figura 4.1. La marca para β -catenina activa está presente en las células de Leydig.

Se llevó a cabo una inmunofluorescencia con el anticuerpo contra β -catenina activa y se muestra la epidermis de una extremidad de ajolote en regeneración. (A) Campo claro del confocal mostrando las grandes y redondas células de Leydig (flechas negras). (B) DAPI. La flecha muestra el núcleo de una célula de Leydig (C) inmunofluorescencia de β -catenina activa. La flecha muestra marca positiva para una célula de Leydig. (D) Co-localización de B y C. La flecha muestra la sobre posición de la marca nuclear con la marca positiva del anticuerpo contra β -catenina activa en las células de Leydig.

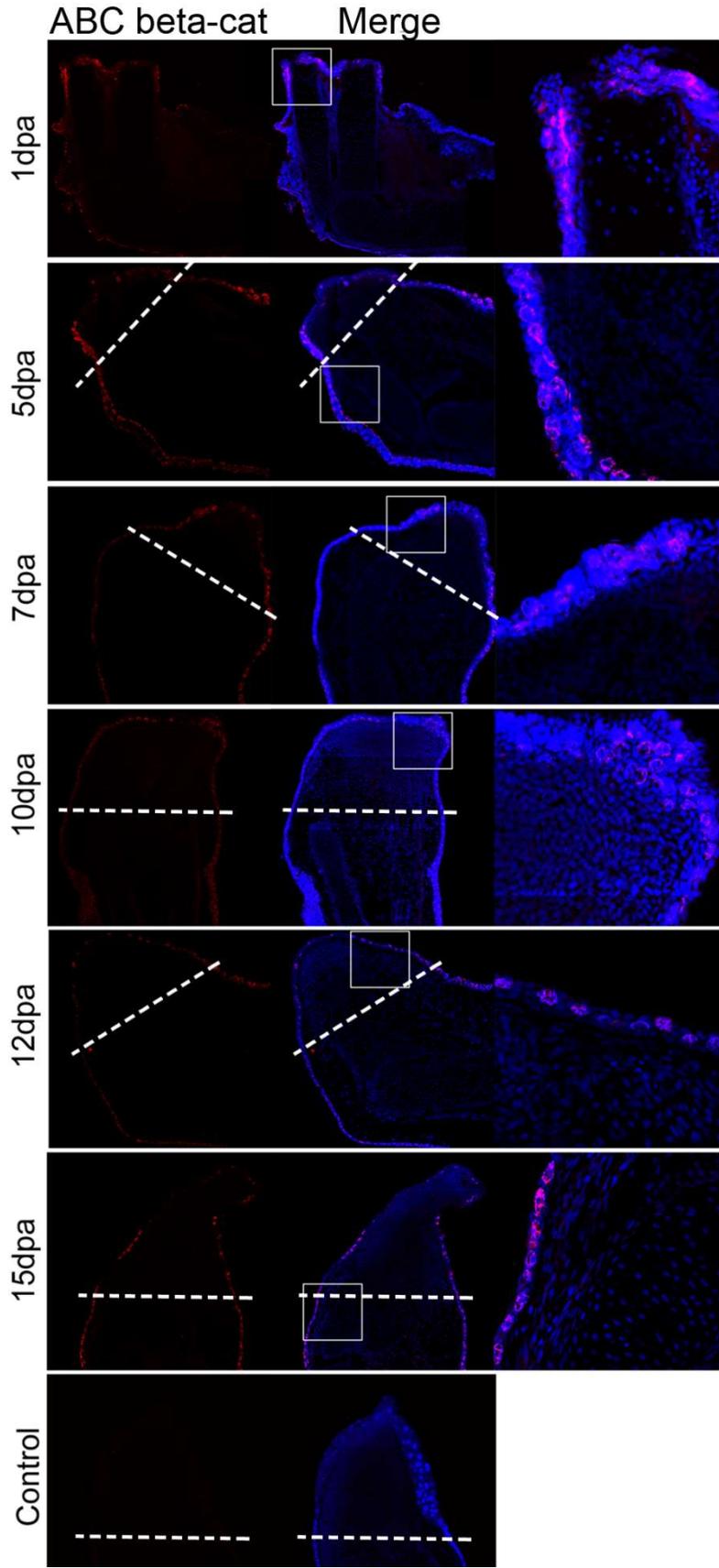


Figura 4.2. Actividad de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina a lo largo del proceso de regeneración. Se llevó a cabo una inmunofluorescencia con el anticuerpo contra β -catenina activa (ABC beta-cat) en cortes histológicos de extremidades de 1, 5, 7, 10, 12 y 15 dpa. La señal positiva se puede observar intensamente y co-localizando con el marcador nuclear DAPI en las células de Leydig del epitelio de toda la extremidad a lo largo del proceso de regeneración; tanto la región que está regenerando como la que no. La línea intermitente blanca muestra el plano de amputación. La columna de la derecha muestra un acercamiento de la co-localización de la columna central.

El fármaco agonista de Wnt activa la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la piel de la extremidad

Con la finalidad de activar la vía de señalización de Wnt/ β -catenina a lo largo del proceso de regeneración se empleó el fármaco agonista de Wnt (2-Amino-4-(3,4-(methylenedioxy) benzylamino)-6-(3-methoxyphenyl) pyrimidine) (Calbiochem). Dicho fármaco es un pequeño compuesto químico que actúa como un potente y selectivo agonista de la vía de señalización de Wnt sin inhibir la actividad de GSK-3 β . Es capaz de mimetizar el efecto de la inducción de β -catenina mediada por Wnt y de la actividad transcripcional dependiente de TCF.

El fármaco agonista de Wnt activa la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en la línea celular de cáncer de colon RKO

Primeramente, se llevó a cabo una prueba para comprobar la funcionalidad del fármaco mediante un ensayo de actividad de luciferasa responsivo a TCF/LEF con la línea celular de cáncer de colon RKO que, a diferencia de varias líneas de cáncer de colon, no tiene sobre-activada la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Como se muestra en la figura 4.3, dicho ensayo se realizó en ausencia de compuestos, en presencia de 100 ng/ml de la proteína Wnt3a o en presencia de distintas concentraciones del fármaco agonista de Wnt. FOP es el plásmido control, el cual no responde a la activación de la vía de señalización mediada por Wnt y como consecuencia muestra menores niveles de actividad de luciferasa. TOP representa el plásmido responsivo a Wnt sin estímulo, por lo tanto, se trata de la actividad basal de las células RKO. El tratamiento por 8 horas con 100 ng/ml de la proteína Wnt3a incrementa la actividad de la luciferasa y 1 μ M del fármaco agonista de Wnt es capaz de mimetizar este mismo efecto. Una dosis siete veces mayor del fármaco incrementa aún más la actividad, pero esta se estabiliza para una concentración de 10 μ M.

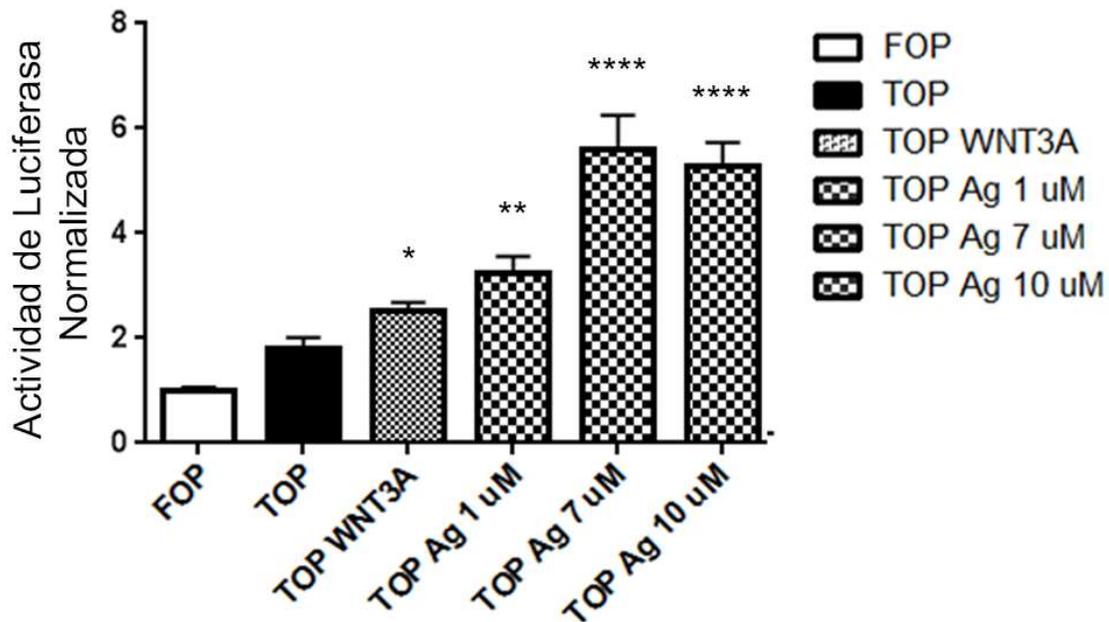


Figura 4.3 El fármaco agonista de Wnt incrementa la actividad transcripcional dependiente de β -catenina en una línea celular de cáncer de colon. Las células RKO se co-transfectaron con pRL y el plásmido reportero TOPFlash o FOPFlash (Control). 24 horas posteriores a la transfección, las células fueron crecidas en ausencia de suero (2%) por 12 h posterior a lo cual se añadió al medio por 8 horas, la proteína Wnt3a (100ng/ml) o el fármaco agonista de Wnt con la finalidad de estimular a las células. Después de incubar a las células en presencia o ausencia del químico, éstas se lavaron, lisaron y la actividad de la luciferasa se analizó. La actividad se normalizó con respecto a la actividad de la proteína Renilla Luciferasa. Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. Para TOP los valores son: 1.818 ± 0.2015 , para Wnt3a: 2.514 ± 0.1663 ; para el agonista de Wnt 1 μ M: 3.251 ± 0.3122 ; para el agonista de Wnt 7 μ M: 5.615 ± 0.6369 , y para el agonista de Wnt 10 μ M: 5.265 ± 0.4617 . Los resultados representan el promedio \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

El fármaco agonista de Wnt incrementa la vía de señalización Wnt/ β -catenina en las células de Leydig durante la regeneración de la extremidad del ajolote

Con la finalidad de probar si el fármaco tiene algún efecto durante la regeneración de la extremidad y de encontrar la dosis adecuada para ello, se administraron diferentes concentraciones del agonista de Wnt diluida en el agua, en un tratamiento que se aplicó los primeros 7 dpa. Las extremidades fueron analizadas al final del periodo normal que toma a un animal de esas dimensiones regenerar, que es cercano a los 30 dpa. Las dosis empleadas fueron 0.25 μ M, 1 μ M y 2.5 μ M. La primera dosis no tuvo efecto sobre la regeneración, mientras que la segunda dosis causó la inhibición completa de la regeneración y la dosis de 2.5 μ M causó la muerte del animal. Basándonos en estos resultados se decidió emplear la dosis de 1 μ M en todos los tratamientos futuros.

Posteriormente se confirmó el efecto del agonista de Wnt sobre la vía de señalización Wnt en las extremidades regenerantes. Animales con una extremidad en regeneración de 12 dpa se trataron por 24 horas con el fármaco. Concluido el tiempo de tratamiento las extremidades se colectaron y se trataron para una inmunofluorescencia usando un anticuerpo contra β -catenina activa. Se eligió este momento de regeneración puesto que la extremidad del animal en este periodo posee un blastema bien formado, permitiéndonos evaluar de esta manera si el fármaco también afectaba dicha estructura, típica de la regeneración. Como se muestra en la figura 4.4 el fármaco agonista de Wnt incrementa la unión del anticuerpo a las células de Leydig del epitelio, co-localizando con la marca nuclear DAPI, en comparación con un animal control tratado con el vehículo (DMSO). Este hecho sugiere que el fármaco agonista de Wnt efectivamente está teniendo un efecto sobre la vía de señalización Wnt/ β -catenina. El fármaco parece no tener un efecto ectópico sobre la activación de la vía, pues como se aprecia en la figura 4.4 la marca parece únicamente exacerbada y no se aprecia que colocalice con la marca nuclear DAPI en alguna otra región de la extremidad en donde no haya estado presente la marca de una muestra control.

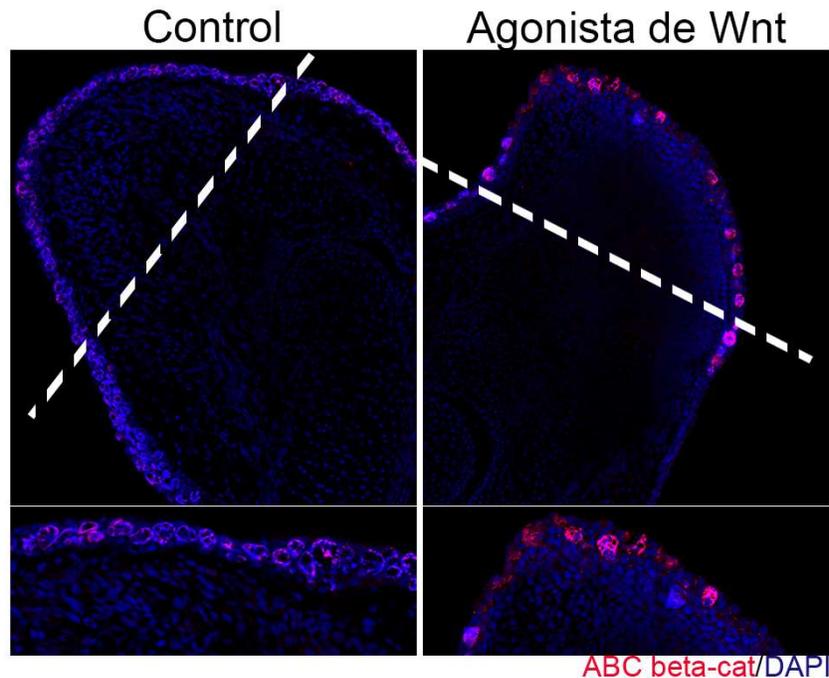


Figura 4.4 El fármaco agonista de Wnt incrementa la marca del anticuerpo contra β -catenina activa. Animales con extremidades de 12 dpa fueron tratados por 24 h con DMSO (control) o con el agonista de Wnt [1 μ M]. Al finalizar el tratamiento las extremidades se colectaron y procesaron para cortes histológicos con la finalidad de llevar a cabo una inmunofluorescencia con un anticuerpo contra β -catenina activa. La marca positiva se puede observar con mayor intensidad en las extremidades de los animales tratados con el fármaco, en comparación con las extremidades de los animales control. La línea intermitente blanca muestra el plano de la amputación.

El fármaco agonista de Wnt afecta la expresión de genes blanco de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la regeneración de extremidades

Con la finalidad de corroborar de otra manera el efecto del fármaco sobre la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, se analizó la expresión de dos genes blanco característicos de dicha vía de señalización, *c-myc* y *axina2*. Para ello, ajolotes con extremidades de 12 dpa se trataron por 12 horas con el fármaco agonista de Wnt. Una vez terminado el periodo de tratamiento, las extremidades fueron colectadas y se les retiró la piel para que con ésta se llevara a cabo una RT-PCR con un pool de

8 extremidades controles y 8 extremidades de animales tratados. El motivo por el cual se seleccionó la piel y no toda la extremidad, es que -como se observa en la figura 4.2 y 4.4,- es el epitelio el que posee la mayor actividad y de esta manera se puede obtener un tejido más enriquecido, haciendo que el resultado se haga más evidente. Como nos revela la imagen del gel de la RT-PCR y la gráfica que se muestran en la figura 4.5, los animales tratados con el agonista de Wnt tienen significativamente ($*p<0.05$) mayor expresión tanto de *c-myc* como de *axina2* en comparación con los animales controles tratados con el vehículo. De esta manera se confirma que el fármaco agonista de Wnt efectivamente activa genes regulados por la vía de señalización Wnt/ β -catenina.

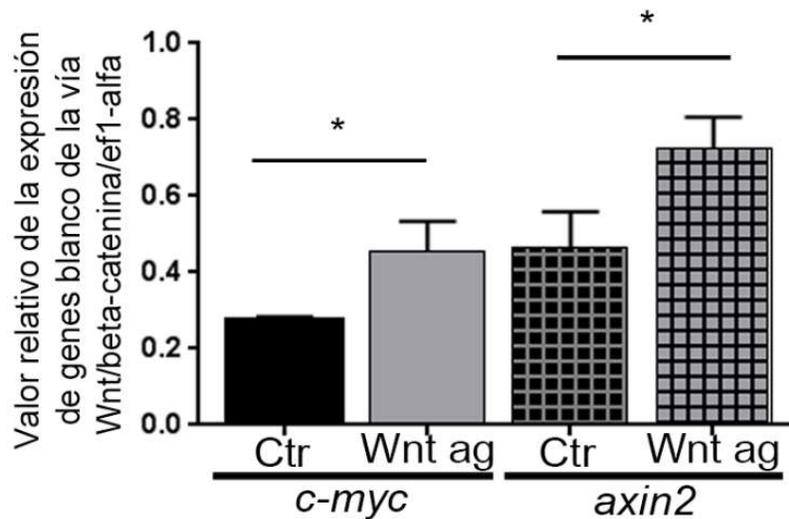


Figura 4.5 El fármaco agonista de Wnt incrementa la expresión de genes blancos de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Animales con extremidades 12 dpa fueron tratados por 12 horas con el agonista de Wnt [$1 \mu\text{M}$] o con DMSO. Posteriormente las extremidades se colectaron y se les retiró la piel para con ella llevar a cabo una RT-PCR de los genes blanco de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, *c-myc* y *axina2*. *ef1- α* se consideró el gen control. Los genes *c-myc* y *axina2* incrementan significativamente con el tratamiento experimental. La gráfica representa el valor relativo de la expresión de *c-myc/ef1- α* y de *axina2/ef1- α* en controles (vehículo) y en animales tratados con el agonista de Wnt. Los valores relativos de la expresión de *c-myc* y de *axina2* para los controles fueron de 0.273 ± 0.006 y 0.466 ± 0.053 respectivamente. Los valores relativos de la expresión en animales tratados con el agonista de Wnt fueron de 0.456 ± 0.045 para *c-myc* y de 0.726 ± 0.047 para *axina2*. $*p<0.05$ para ambos genes.

Estructura esquelética de una extremidad anterior de ajolote

Con la finalidad de facilitar la comprensión de las modificaciones esqueléticas ocasionadas por el fármaco que se muestran más adelante, la figura 4.6 nos muestra mediante la tinción de Rojo de Alizarina y Azul Alciano la estructura esquelética de una extremidad anterior de un ajolote normal. Esta estructura está compuesta por el húmero en la región del estilópodo, por el radio y la ulna en la región del zeugópodo y finalmente el autópodo está compuesto por 8 carpos, 4 metacarpos y las falanges que están constituidas por 2, 2, 3 y 2 elementos, correspondiendo al dígito I, II, III y IV respectivamente.

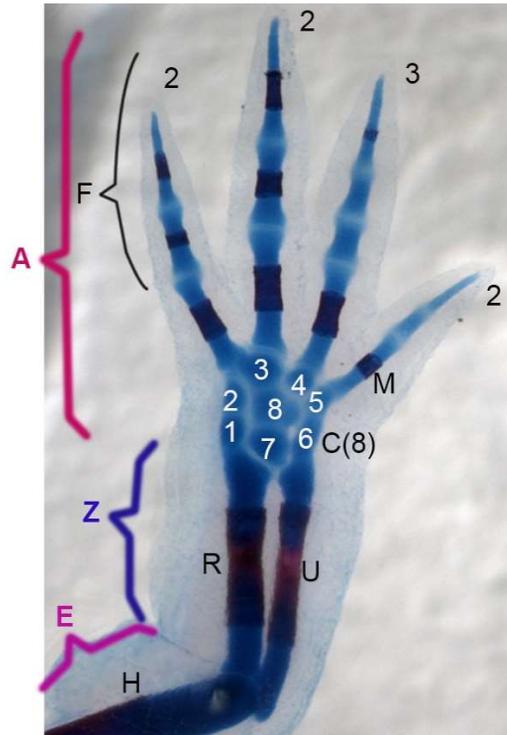


Figura 4.6 Estructura esquelética de la extremidad anterior de un ajolote que regenera de manera normal. La extremidad regenerada de un ajolote de 5-6 cm se colectó a los 30 dpa y se teñió mediante la técnica de tinción de esqueleto de Azul Alciano y Rojo de Alizarina. En azul se muestran las estructuras de cartilago, mientras que en rojo se muestran las estructuras óseas. El eje anterior se muestra en la parte izquierda y la posterior en la derecha. A= autópodo, Z= zeugópodo, E= estilópodo, F= falanges (Anterior-Posterior= 2, 2, 3 y 2), M = metacarpo, C= carpos (8 en total), R= radio, U= ulna, H= húmero.

Al activar químicamente la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes etapas de regeneración de la extremidad del ajolote el proceso de regeneración se ve afectado de manera negativa en dos ventanas de tiempo

Con la finalidad de dilucidar cuál es el efecto de activar la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en diferentes momentos a lo largo del proceso de regeneración, como se ilustra en la figura 4.7 A, los ajolotes amputados se trataron con el fármaco agonista de Wnt (con una duración de tres días) en distintas ventanas de tiempo, a lo largo del proceso de regeneración de la extremidad, abarcando así diferentes etapas de la regeneración (curación de la herida, formación de blastema, morfogénesis). Además de los animales experimentales, los controles fueron tratados con el vehículo (DMSO) en las mismas condiciones. Un representante de estos controles se muestra en la figura 4.7 B. Ninguno de los animales tratados con el vehículo presentaba anomalías y todos regeneraron en un periodo de 30 días. La tabla 4.1 ilustra el resumen de los resultados de los experimentos que se describen a continuación.

La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la etapa de curación de la herida afecta de manera negativa el proceso de regeneración en los tratamientos dados a las 0 y 24 horas posteriores a la amputación

Las ventanas de tratamiento que abarcaron el proceso de curación de la herida comenzaron a los 0, 1 y 2 dpa en los cuales, los animales fueron expuestos por un periodo de 3 días al fármaco. Cercano a los 30 días, que es el tiempo en que un control regeneró (fig. 4.7 B), los animales se examinaron para corroborar el avance de la regeneración. Si ésta aparentaba estar retrasada, se permitió al animal regenerar unos días más antes de colectar la extremidad. Una vez colectada la extremidad se llevó a cabo la tinción de esqueleto de Azul Alciano y Rojo de Alizarina.

Cuando los animales fueron tratados a los 0 dpa por un periodo de 3 días, no se observó regeneración de las estructuras distales a la amputación en 2 de 4 casos,

los otros 2 casos regeneraron de manera normal, aunque con un poco de retraso, ya que la regeneración concluyó a 35 dpa (fig. 4.7 C)

En la segunda ventana de tratamiento que comenzó 24 horas posterior a la amputación, cinco de las siete extremidades de los animales tratados no regeneraron ninguna estructura distal al plano de amputación (fig. 4.7 D), las otras dos extremidades únicamente regeneraron la porción del eje posterior de la extremidad. De estas dos extremidades una poseía un dígito ectópico que surgía de la falange más proximal del segundo dígito. El dígito I estaba ausente (fig. 4.8 A). En la otra extremidad, los dígitos I y II no estaban presentes (fig. 4.8 B).

El tercer periodo de tratamiento que abarcaba el proceso de curación de la herida, comenzó 48 horas posterior a la amputación y como todas las demás ventanas de tratamiento, comprendió un periodo de tres días de exposición al fármaco. Para esta ventana de tratamiento todos los animales regeneraron sin malformaciones, aunque con un retraso de 6 días (fig. 4.7 E). Por lo tanto, durante la ventana que abarca la etapa de curación de la herida, se observa que los animales tratados a las 0 y 24 horas, con el fármaco agonista de Wnt, se ven afectados por el tratamiento y esta afectación ya no se observa en el tratamiento dado 48 horas posteriores a la amputación.

La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la etapa de formación del blastema no se ve afectada de manera negativa en los tratamientos dados a los 7 dpa, sin embargo, produce malformaciones esqueléticas en los tratamientos dados a los 10 y 12 dpa

La evaluación del efecto del fármaco agonista de Wnt durante la etapa de formación del blastema se llevó a cabo con tratamientos a los 7, 10 y 12 dpa. Cuando los animales se expusieron al fármaco a los 7 dpa, no se observaron anomalías en la extremidad regenerada, salvo por el retraso en el proceso de regeneración (las extremidades se colectaron a los 36 dpa) y un caso de una extremidad con un carpo fusionado que se muestra mediante una flecha en la figura 4.7 F.

Los tratamientos que se llevaron a cabo al final del proceso de la formación del blastema (10 y 12 dpa) presentaban afectaciones en la extremidad regenerada (3/3

para ambas ventanas de tratamiento). En la ventana de tratamiento llevada a cabo a los 10 dpa, como se muestra en la figura 4.7 G, uno de los animales desarrolló únicamente un dígito y un tipo de protuberancia que probablemente se trataba de un segundo dígito. En esta extremidad no se formaron los carpos y el radio presentó una bifurcación (señalado por la flecha en la figura 4.7 G). La figura 4.8 C y 4.8 D, nos muestran los otros dos fenotipos que se obtuvieron con la ventana de tratamiento que corresponde a los 10 dpa. En el primer caso se observa que únicamente se formaron 3 dígitos, aunque también se alcanza a apreciar una ligera tinción en Azul Alciano en la parte más posterior (señalado por la flecha en la figura 4.8 C). Debido a que esta estructura ligeramente teñida se encuentra bastante separada de los carpos, es difícil identificarla como un dígito. También se puede observar que de los tres dígitos que se formaron en esta extremidad, el que se encuentra en la región más anterior posee únicamente una pequeña falange, el dígito que le sigue fue el más completo, aunque carecía de la articulación más distal y el dígito más posterior presentaba únicamente dos falanges. La mayoría de los carpos de esta extremidad estaban fusionados.

Como nos muestra la figura 4.8 D el otro caso de la extremidad tratada a los 10 dpa se desarrolló casi con normalidad, sin embargo, este ejemplo no desarrolló completamente el dígito más posterior. Interesantemente ninguno de los animales tratados en esta ventana de tiempo, presentaron osificación (como se evidencia por la falta de tinción con rojo de Alizarina).

Como se muestra en las figuras 4.7 H, 4.8 E y 4.8 F, todos los animales que fueron tratados en la ventana de tratamiento que correspondía a los 12 dpa, tenían en diferente grado de severidad ausencia de dígitos en la extremidad regenerada. Dos de estas extremidades, las mostradas en las figuras 4.7 H y 4.8 E, presentaron fenotipos muy similares, mostrando únicamente tres dígitos delgados y sin articulación; los primeros dos dígitos anteriores, largos y aproximadamente de la misma longitud y el dígito más posterior de una longitud reducida. La tercera extremidad, mostrada en la figura 4.8 F, formó dos dígitos reducidos en tamaño y también sin articulaciones. Todas las extremidades tratadas en esta ventana de tiempo tuvieron los carpos fusionados.

La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la etapa de morfogénesis no causa grandes anomalías en la extremidad regenerada

Cuando el tratamiento comenzó al inicio del proceso de morfogénesis (15 dpa), no se observaron grandes anomalías en la extremidad regenerada; sin embargo, se observó un retraso en el desarrollo de la regeneración (3/3). A los 35 dpa todas las extremidades ya habían regenerado los 4 dígitos. Dos de las extremidades como la que se muestra en figura 4.7 I presentaron una ligera malformación, la cual consistía en que al dígito III le faltaba una falange, haciéndolo similar a un dígito IV. Dicho dígito se observó más delgado en la base del metacarpo y por lo tanto con una mayor separación de la base de la mano en comparación con el resto de los dígitos (señalado mediante una flecha en la figura 4.7 I).

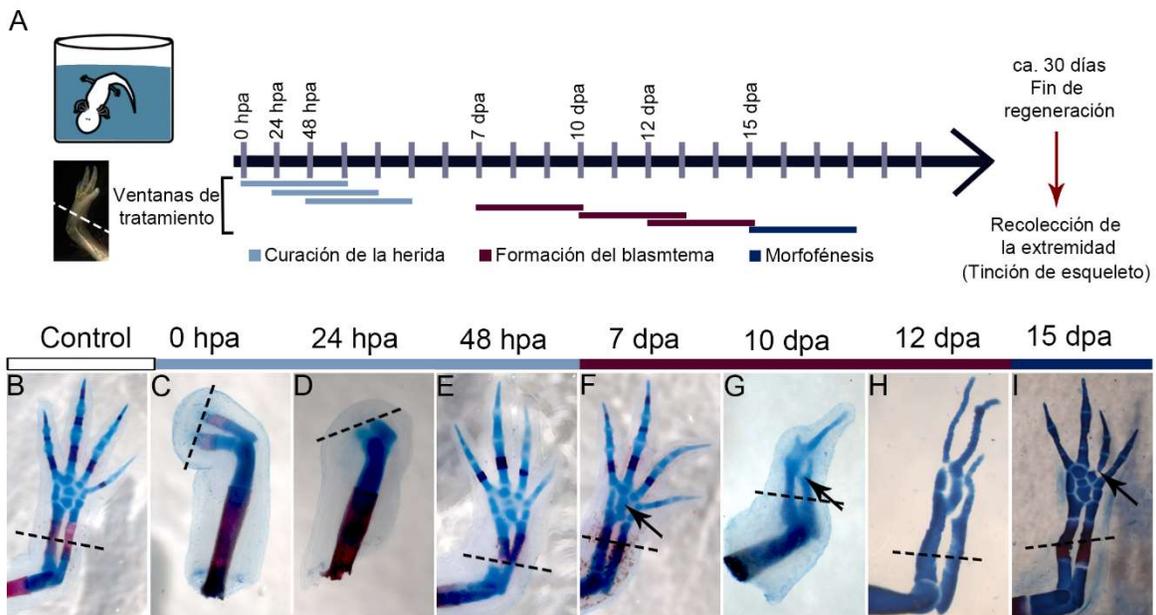


Figura 4.7 La regeneración de la extremidad no se logra de manera adecuada, al tratar los animales con el agonista de Wnt en dos diferentes ventanas de tiempo a lo largo del proceso de regeneración. Se trataron animales amputados a mitad del zeugopodo en diferentes periodos de tiempo con el fármaco agonista de Wnt o con DMSO. Esto se llevó a cabo sumergiendo a los animales en agua de pecera con el fármaco en una concentración final de 1 μ M por 3 días. Alrededor del tiempo en el que las extremidades controles ya terminaron de regenerar, las extremidades se colectaron para llevar a cabo con ellas, una tinción de esqueleto (A). Cuando el fármaco se administró a las 0 y 24 hpa, antes de que el blastema se forme (línea azul claro en la flecha de la línea del tiempo), la regeneración se inhibe completamente o la extremidad regenerada no se forma

de manera adecuada (C y D). Los animales tratados 48 hpa y durante la formación del blastema (línea morada en la flecha de la línea del tiempo) a los 7 dpa, formaron extremidades normales (E y F), salvo ligeras anomalías, como fusiones de elementos esqueléticos (fecha en F). Las extremidades regeneradas de animales tratados 10 dpa y 12 dpa regeneraron de manera anormal (G y H). A los 10 dpa se pueden observar anomalías como bifurcación de los elementos esqueléticos (flecha en G) y ausencia de algunos dígitos o dígitos más delgados. También se observó que algunos elementos esqueléticos estaban fusionados. Los animales que fueron tratados 15 dpa, al comienzo de la morfogénesis (línea azul oscuro en la flecha de la línea del tiempo), regeneraron las extremidades de manera normal salvo por la falta de una falange en el dígito III (flecha negra, I) en 2 de 3 casos. La línea negra intermitente indica el plano de amputación

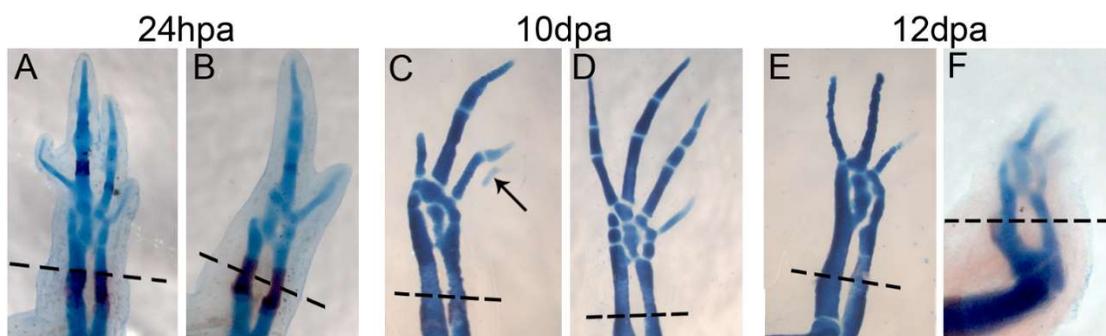


Figura 4.8 Otras extremidades regeneradas afectadas por el tratamiento con el agonista de Wnt. La tinción de esqueleto muestra otros fenotipos que se obtuvieron al tratar a los animales en la ventana de tiempo de 24 hpa (A, B); 10 dpa (C,D) y 12 dpa (E,F). La flecha en C muestra una estructura cartilaginosa difícil de identificar como un dígito. La parte anterior de la extremidad corresponde al lado derecho y la posterior al izquierdo.

Ventana de tratamiento	Morfología normal	Muñón sin regenerar	Morfología anómala
0 hpa	2	2	0
24 hpa	0	5	2 extremidades a las cuales les faltaba la parte anterior
48 hpa	4	0	0
7 dpa	4	0	0
10 dpa	0	0	3 extremidades con malformaciones esqueléticas
12 dpa	0	0	3 extremidades con malformaciones esqueléticas

15 dpa	1	0	2 extremidades con una falange faltante en el dígito III
--------	---	---	--

Tabla 4.1. Resumen de la morfología final de extremidades regenerantes obtenidas a raíz de haber tratado a los animales en diferentes ventanas de tiempo por un periodo de tres días.

Las extremidades tratadas con el agonista de Wnt no son capaces de recuperarse si se les permite regenerar por un periodo más prolongado

Con la finalidad de determinar si el efecto de inhibir la regeneración de la extremidad al tratar a los animales con agonista de Wnt era reversible, a los ajolotes que fueron tratados en la ventana de tiempo de 24 horas post amputación por un periodo de tres días, se les permitió regenerar por un periodo de 3 meses antes de colectar la extremidad. Lo que se obtuvo como resultado fue que ningún animal fue capaz de recuperarse (fig. 4.9 A) (n=4), con excepción de la extremidad de un individuo que desarrolló tardíamente un tipo de dígito proyectado desde la ulna (aunque ningún carpo) y otro tipo de elemento esquelético que surgía del lado del radio. Interesantemente esta estructura esquelética que regeneró no presentó osificación, pero sí articulaciones (fig. 4.9 B).

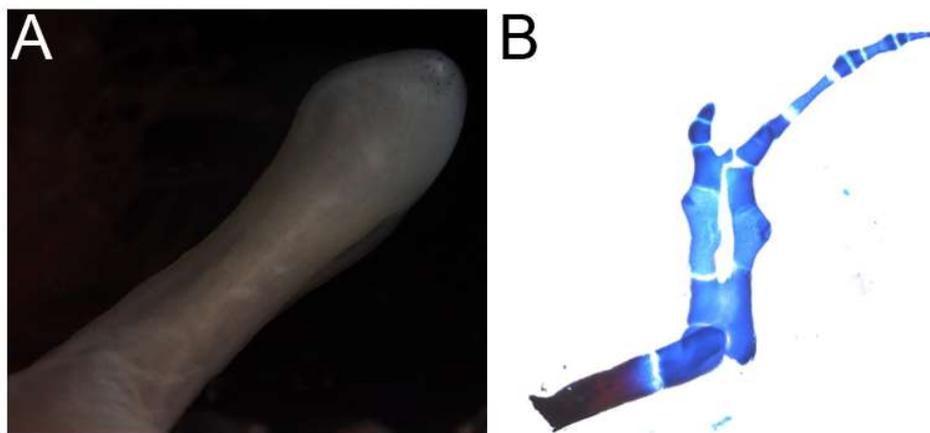


Figura 4.9 Las extremidades tratadas con el agonista de Wnt que no son capaces de recuperarse si se les permite regenerar por un periodo de 3 meses. A algunos animales tratados 24 hpa con el agonista de Wnt se les permitió regenerar por 3 meses con la finalidad de corroborar si la regeneración podía recuperarse, sin embargo, no se observó distalización en la mayoría de los

casos (4/5) (A). Una sola extremidad regeneró un tipo de dígito y una estructura aledaña. No formó carpos ni tampoco presentó osificación (B).

Las extremidades que no regeneran debido al tratamiento con el agonista de Wnt desarrollan una cicatriz

A las extremidades que se les permitió regenerar por 3 meses se les realizó la tinción tricrómica de Masson con la finalidad de poder analizar si existía la posibilidad de formar una cicatriz. La figura 4.10 A y su acercamiento (fig. 4.10 B) nos muestran la presencia de tejido fibrótico, evidenciado por el color rosa que nos da la tinción. También se observa un desarreglo en las fibras de colágena (mostrado en azul por la tinción), en comparación con la presencia de fibras mejor organizadas en una región de la extremidad que no fue amputada, lo cual también es característico de una cicatriz (fig. 4.10 C).

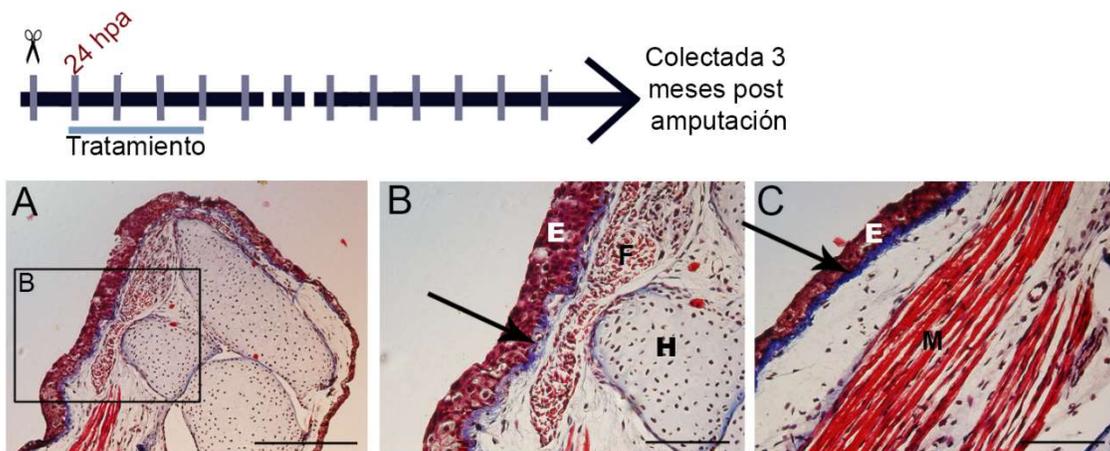


Figura 4.10 La inhibición de la regeneración forma una cicatriz. Algunas extremidades tratadas en la ventana de tiempo de 24 hpa a las cuales se les permitió regenerar por tres meses fueron colectadas y se tiñeron con la técnica de Tricrómica de Masson con la finalidad de observar la presencia de una posible cicatriz (A, B). Esta tinción permite ver la presencia de tejido fibrótico en un acercamiento (B) además de un desarreglo en las fibras de colágena (señalado mediante una flecha en B) comparado con una sección de la extremidad que no fue amputada (señalado mediante una flecha en C), lo que sugiere la formación de una cicatriz. E: epidermis, F: tejido fibrótico, H: hueso, M: músculo. La escala equivale a 500 μ m en A y a 200 μ m en B y C.

La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en etapas anteriores a la formación del blastema inhibe la futura formación del blastema

Con la finalidad de determinar los cambios histológicos presentados durante la regeneración de la extremidad en animales tratados con el agonista de Wnt, se procesaron ajolotes controles y ajolotes tratados por 3 días con el fármaco en la ventana de tratamiento en donde se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición de la regeneración (24 hpa), haciendo cortes en parafina a los 2, 4, 7, 10 y 15 dpa (fig. 4.11). La figura 4.11 nos muestra que en las extremidades control, a los 2 dpa el epitelio ya ha cubierto el muñón (flecha roja), a los 7 dpa un blastema se ha formado (flecha verde) y posteriormente incrementa su tamaño. Interesantemente en animales tratados con el agonista de Wnt se observa un retraso en la epitelialización de la herida (flecha azul), sin embargo, a los 4 días se puede apreciar que el cerrado de la herida se ha completado (flecha naranja). La desdiferenciación también se aprecia en animales tratados (mostrado con una flecha blanca a los 10 dpa), sin embargo, el blastema no llega a formarse, como se aprecia a los 15 dpa de animales tratados, en comparación con animales no tratados con el fármaco. Es muy normal que después de la amputación los huesos se protruyan debido a una contracción muscular. Esto es lo que se observa en el control a los 2 dpa. El borde de la membrana basal nos permite determinar el nivel al cual se cortó la extremidad (mostrado mediante una flecha negra a los 2 dpa en el control).

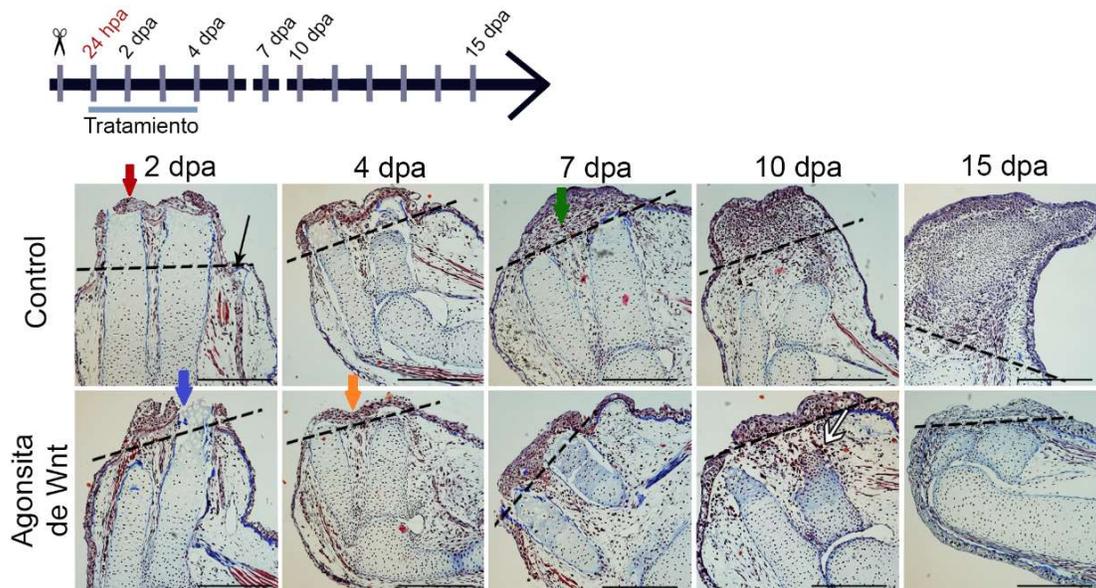


Figura 4.11 Los animales tratados con el agonista de Wnt al inicio de la regeneración de la extremidad no forman blastema. Las extremidades de animales tratados en la ventana de tratamiento de 24 hpa y las extremidades controles se colectaron en diferentes días a lo largo del proceso de regeneración (como se muestra en la flecha de la línea del tiempo) y fueron teñidas con la técnica Tricrómica de Masson. La flecha de la línea de tiempo muestra en letras rojas el comienzo del tratamiento. Las letras negras indican el momento en que las extremidades fueron colectadas. La línea azul claro muestra que el tratamiento abarcaba la etapa de curación de la herida. En una extremidad control se puede observar que 2 dpa el epitelio ya ha cubierto casi completamente el muñón (flecha roja). La flecha negra indica el borde de la membrana basal. A los 7 dpa el blastema está presente (flecha verde) y continúa creciendo hasta que a los 15 dpa se observa un blastema tardío. Por otro lado, un análisis temporal de las extremidades tratadas en la ventana de tiempo de 24 hpa nos muestra que, aunque el epitelio cubre la herida (flecha naranja), lo hace con algunos días de retraso, pues a los 2 dpa aún no ha epitelializado por completo (flecha azul). También se puede observar que el proceso de desdiferenciación está presente (señalado mediante una flecha blanca) y que se acumulan algunas células en la parte más distal del muñón, sin embargo, un blastema nunca llega a formarse. La línea intermitente negra indica el plano de amputación. La escala equivale a 500 μm .

La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en etapas previas a la formación del blastema inhibe la innervación del muñón de la extremidad

Las extremidades denervadas no logran regenerar. No forman blastema, sin embargo, sí presentan desdiferenciación ([Mescher & Tassava 1975](#), [Stocum & Cameron 2011](#)). Debido a esta coincidencia entre el fenotipo que observamos en nuestros tratamientos y el fenotipo obtenido al denervar las extremidades, se hizo una inmunohistoquímica con un anticuerpo contra tubulina acetilada (marcador de nervios), con la finalidad de corroborar el estado de los nervios en animales tratados con el agonista de Wnt en la ventana de tiempo de 24 hpa. Como se observa en la figura 4.12, el muñón de una extremidad de un animal control está innervado a los 3 dpa. En cambio, a los 3 dpa un animal tratado con el agonista de Wnt no lo está. Con la finalidad de probar si existía algún tipo de retraso en el proceso de innervación, se evaluó la marca de tubulina acetilada en extremidades de 7 dpa. Sin embargo, inclusive en este tiempo, no se observó que el muñón estuviera innervado. Estos

resultados nos sugieren que la inhibición de la regeneración de la extremidad observada en animales tratados con el agonista de Wnt antes de la formación del blastema, podría ser causada por la falta de innervación.

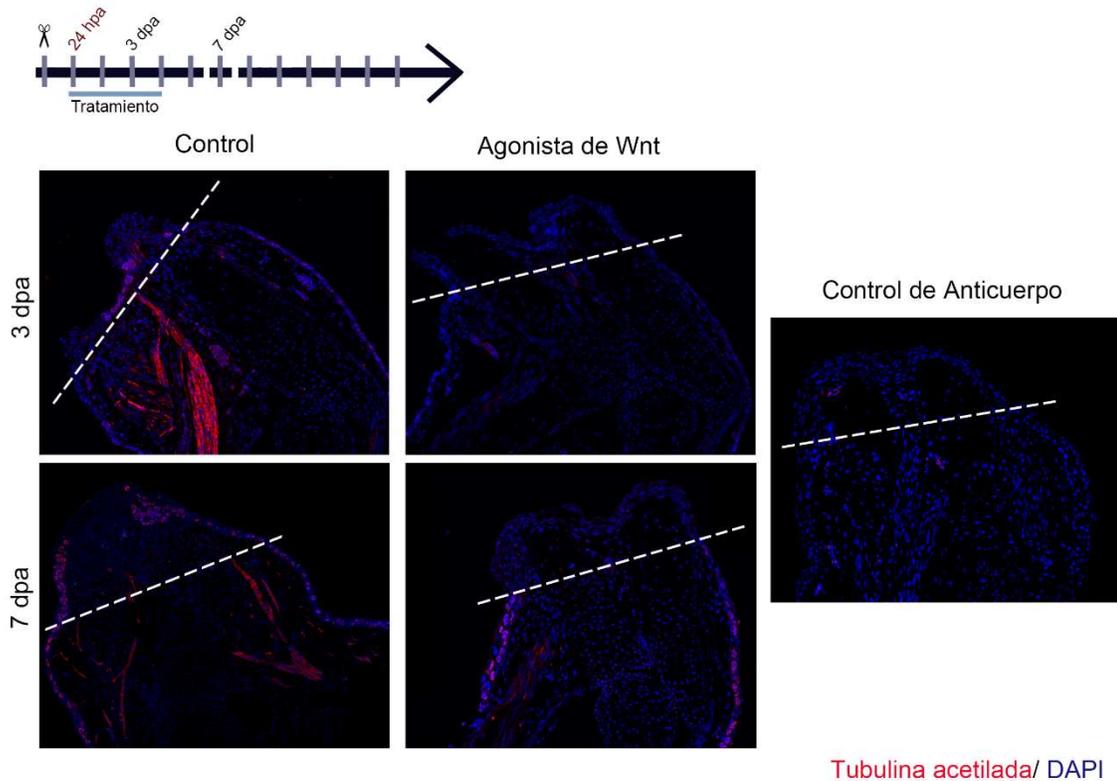


Figura 4.12 Las extremidades de los animales tratados con el agonista de Wnt al comienzo de la regeneración de la extremidad no se innervan. La flecha de la línea de tiempo muestra el comienzo del tratamiento en letras rojas. Las letras negras indican el tiempo en el que la extremidad fue colectada para este experimento y la línea azul claro muestra que el tratamiento abarcaba la etapa de curación de la herida. Una inmunohistoquímica contra tubulina acetilada muestra que el muñón de una extremidad de un animal control de 3 dpa está innervada mientras que ni el muñón de 3 dpa ni el de 7 dpa de una extremidad de un animal tratado lo están.

La activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina induce proliferación en la etapa de formación del blastema aún en extremidades denervadas

Debido a la conocida función de la vía de señalización Wnt/ β -catenina para inducir proliferación celular durante la regeneración del pez cebra ([Stoick-Cooper et al. 2007](#)), decidimos evaluar el índice mitótico en extremidades regenerantes durante el estadio de formación de blastema (una etapa de proliferación celular) en animales expuestos a la activación química de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Para ello, ajolotes de 7 dpa fueron tratados con el agonista de Wnt por un periodo de 24 horas para posteriormente llevar a cabo una inmunohistoquímica contra fosfohistona H3 (PHH3). La figura 4.13 nos muestra que la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina mediante el fármaco agonista de Wnt incrementa significativamente (* $p < 0.0001$) la proliferación celular tanto en el blastema como en el epitelio de la extremidad regenerante en comparación con una extremidad de un animal control.

Por otro lado, durante la regeneración, como se mencionó anteriormente, el papel de los nervios es muy importante para inducir proliferación celular ([Mescher & Tassava 1975](#), [Petrosky et al. 1980](#), [Satoh et al. 2008](#), [Lévesque et al. 2010](#)). Con el propósito de evaluar si la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina era capaz de inducir proliferación a pesar de la ausencia de nervios, las extremidades de ajolotes de 7 dpa fueron denervadas, y 24 horas después tratadas con el fármaco agonista de Wnt por un periodo de 24 horas. La figura 4.14 nos muestra que la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina mediante el fármaco agonista de Wnt incrementa significativamente (* $p < 0.0001$) la proliferación celular tanto en el blastema como en el epitelio de la extremidad regenerante en comparación con una extremidad de un animal control, a pesar de que la extremidad carece de nervios.

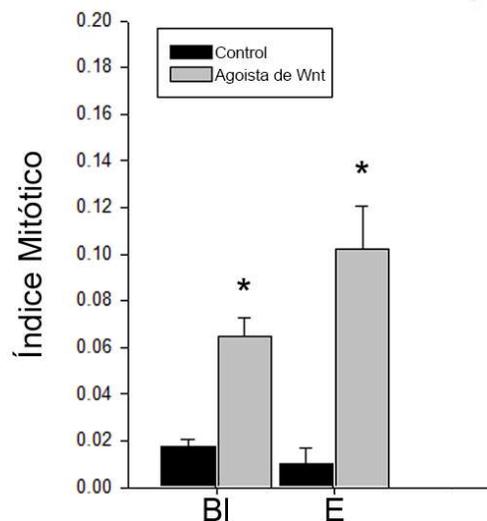
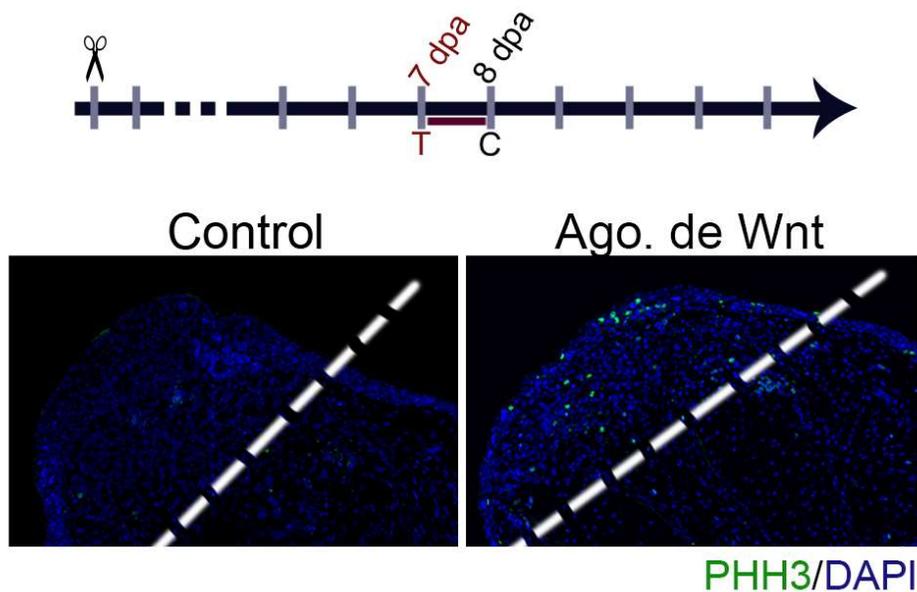


Figura 4.13 El tratamiento con el agonista de Wnt incrementa la proliferación en el blastema y la epidermis. La flecha de la línea del tiempo muestra en letras en tinta roja el comienzo del tratamiento, en negro muestra el momento en que las extremidades fueron colectadas para este experimento y la línea morada indica que el tratamiento abarcaba la etapa de la formación del blastema. Las extremidades de animales tratados a los 7 dpa con el agonista de Wnt por 24 h mostraron significativamente mayor marca positiva para el anticuerpo contra fosfohistona H3 en comparación con los animales control tratados con el vehículo, tanto en el epitelio (E) como en el blastema (BI) como muestra la gráfica (* $p < 0.0001$). $n=4$. La línea intermitente blanca, muestra el plano de amputación.

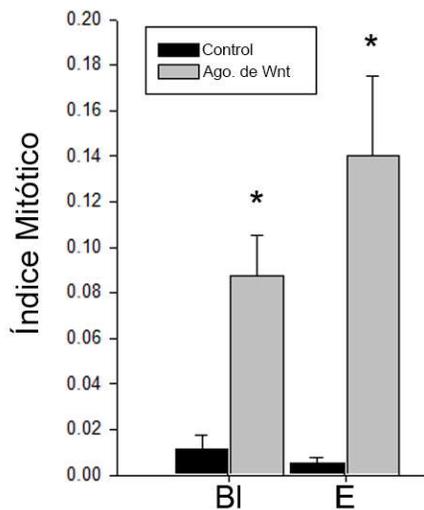
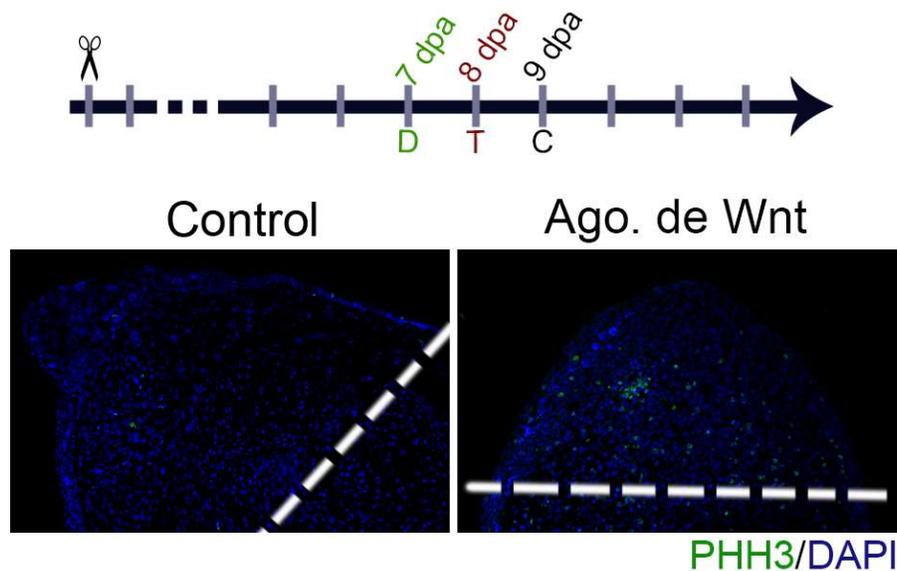


Figura 4.14 El tratamiento con el agonista de Wnt incrementa la proliferación en el blastema y la epidermis aún si la extremidad está denervada. La flecha de la línea del tiempo muestra en letras en tinta roja el comienzo del tratamiento, en negro muestra el momento en que las extremidades fueron colectadas para este experimento, en letras verdes se muestra el momento de la denervación. Se comparó la proliferación celular de extremidades de animales denervados a los 7dpa y tratados a los 8 dpa con el agonista de Wnt por 24 horas contra animales denervados no tratados. Los animales tratados con el fármaco mostraron significativamente mayor marca positiva para el anticuerpo contra fosfohistona H3 en comparación con los animales control tratados con el vehículo, tanto en el epitelio (E) como en el blastema (BI) en extremidades denervadas a los 7dpa, como se evidencia por la gráfica (* $p < 0.0001$) (C). $n=4$. La línea intermitente blanca, muestra el plano de amputación.

La organización del tejido esquelético es anormal en animales tratados con el fármaco agonista de Wnt en etapas posteriores a la formación del blastema

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con el agonista de Wnt en estadios de regeneración posteriores a la formación de blastema resultó en extremidades con elementos esqueléticos fusionados además de falta de osificación (figura 4.7 G y H y figura 4.8 C-F). Como se ilustra en la figura 4.15, los análisis histológicos en extremidades que están en el final del periodo de formación del blastema, que fueron tratadas en esos estadios, muestran que el cartílago no estaba organizado como el tejido esquelético de una extremidad que regeneró de manera normal. También se observa que hay algunas regiones del tejido esquelético que no estaban bien delimitadas (señalado mediante una cabeza de flecha en la figura). Además, en lo que presuntamente es la interzona (señalado mediante una flecha azul), las células no se encontraron tan compactadas como en una interzona normal (señalado mediante una flecha roja). Por otro lado, en general, los núcleos celulares se observaron más grandes y la distribución celular más homogénea y no de manera columnar.

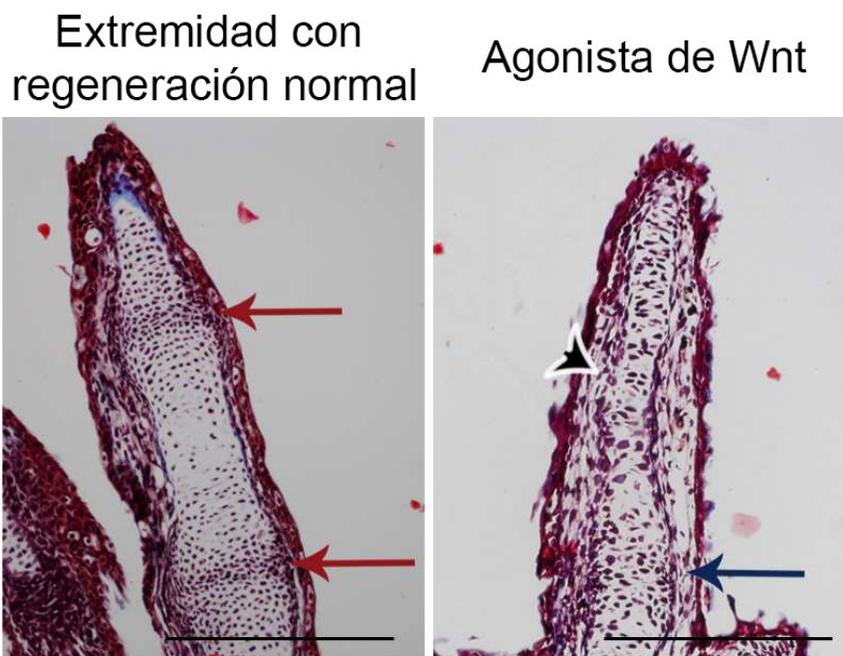


Figura 4.15. El tratamiento con el agonista de Wnt causa un tejido esquelético desorganizado. Las extremidades se colectaron alrededor de los 30 días post amputación en animales tratados con

el agonista de Wnt a los 12 dpa y posteriormente fueron teñidas con la técnica Tricrómica de Masson con la finalidad de analizar las características del tejido. Un dígito de una extremidad que regeneró de manera normal muestra una organización típica de un tejido esquelético endocondral, en donde las células están mayormente condensadas en la interzona (las articulaciones se muestran señaladas mediante flechas rojas) y más expandidas en la región media de la unidad esquelética (hueso). Un animal tratado con el agonista de Wnt en la ventana de tratamiento de 12 dpa muestra un arreglo del tejido esquelético muy distinto. Las células de la posible interzona (flecha azul) no están condensadas y las células están en general distribuidas de manera más homogénea. Los núcleos celulares se observan también más grandes. En algunas partes el tejido esquelético no se observa bien delimitado (cabeza de flecha). La escala es equivalente a 500 μm .

El tratamiento con el agonista de Wnt no afecta la expresión de sox9

Durante el desarrollo de la extremidad Sox9 es un importante factor de transcripción para la diferenciación del cartílago, y junto con Sox8 uno de los marcadores más tempranos que se sabe se expresan en la cascada molecular de la condrogénesis ([Chimal-Monroy et al. 2003](#)). Debido a las malformaciones esqueléticas que se obtuvieron con los experimentos y debido a que durante el desarrollo, Sox9 es regulado de manera negativa por la vía de señalización Wnt, se especuló que también durante la regeneración de la extremidad sox9 se vería afectado de manera similar y que esto explicara las malformaciones obtenidas al tratar a los animales en la ventana de tratamiento de formación de blastema. Con el propósito de estudiar la expresión de sox9 durante la regeneración, animales de extremidades de 12 dpa se trataron con el fármaco agonista de Wnt por un periodo de 24 horas. Se escogió esta duración del tratamiento, ya que se han observado cambios en la expresión de Sox9 en tiempos más cortos durante el desarrollo de la extremidad ([Day et al. 2005](#)). Posterior al tratamiento, las extremidades fueron colectadas con la finalidad de llevar a cabo una hibridación *in situ* para sox9.

Como se muestra en la figura 4.16, no se observaron cambios en la expresión de este gen entre animales tratados con el agonista de Wnt y animales controles (4/4). Con la finalidad de asegurarse que la falta de efecto no se debiera a que el compuesto era incapaz de penetrar hasta el blastema, los animales no fueron sumergidos en el fármaco, en lugar de ello, se emplearon perlas embebidas en 10

mM del agonista de Wnt y se insertaron dentro del blastema. Tampoco en este caso se aprecian diferencias (3/3). Esto sugiere que la expresión de *sox9* no parece estar afectada por el agonista de Wnt.

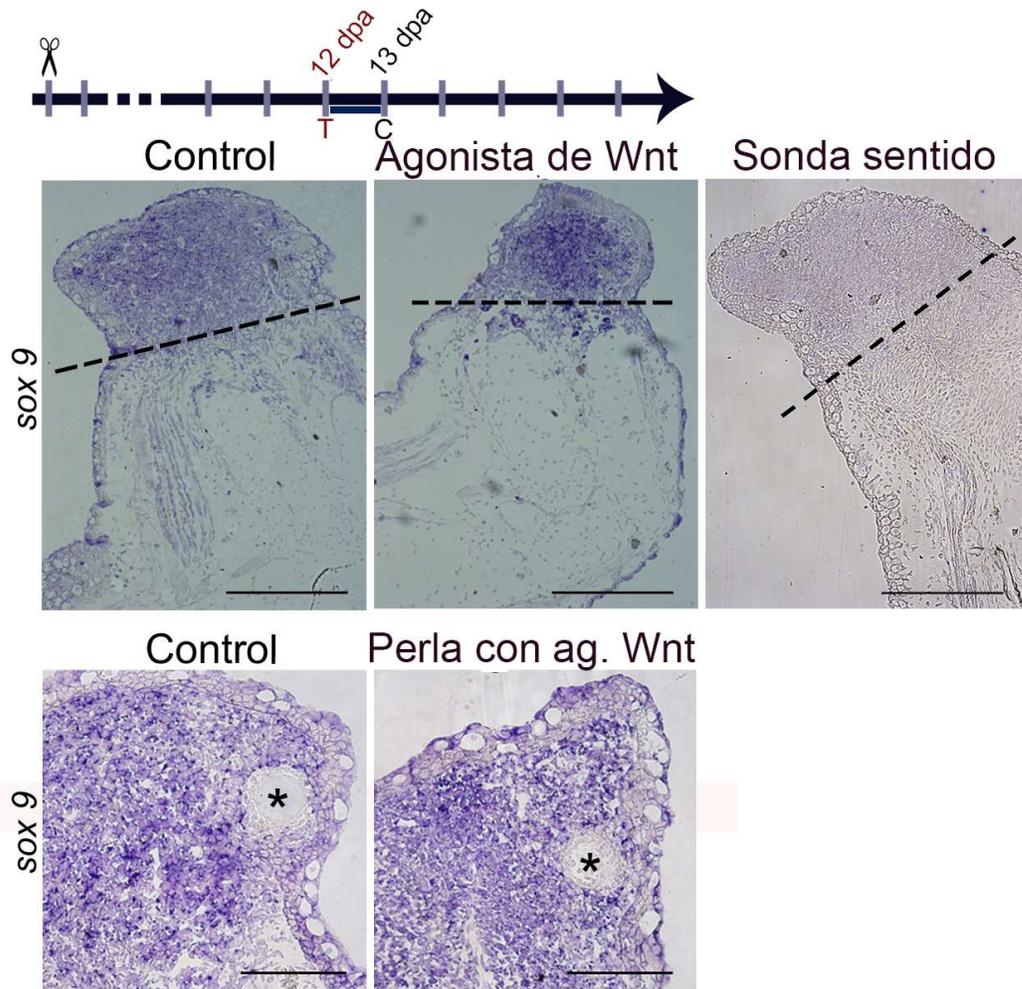


Figura 4.16. El tratamiento con el agonista de Wnt no afecta la expresión de *sox9* 24 horas posteriores al tratamiento. Línea de tiempo mostrando el momento del tratamiento y la duración de un tratamiento sumergiendo un animal o incrustándole en el blastema una perla embebida en agonista de Wnt. Las letras rojas indican el comienzo del tratamiento y las letras negras indican el momento en el que se colectaron las extremidades para este experimento; la línea morada indica que el tratamiento abarcaba la etapa de formación de blastema. La expresión de *sox9* no se ve alterada en animales expuestos a los 12 dpa por 24 horas a 1 μ M del agonista de Wnt o al vehículo. Las líneas intermitentes indican el plano de amputación. La línea de escala equivale a 500 μ m, n=4. La expresión de *sox9* en animales tratados a los 12 dpa por 24 h con una perla (asterisco) embebida en 10 mM del agonista de Wnt o el vehículo tampoco se ve alterada, en este caso, la escala equivale a 200 μ m, n=3.

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo consistió en determinar el efecto que tiene la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes momentos, a lo largo del proceso de regeneración de la extremidad del ajolote.

Primeramente, se estableció que la actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina está presente principalmente en las células de Leydig (células glandulares) del epitelio de ajolote, tanto en la región de la extremidad que está regenerando, como en la que no, a lo largo de todo este proceso.

El epitelio del ajolote es pseudo-estratificado y contiene células epiteliales y células de Leydig. Estas son células especializadas que poseen un citoplasma altamente granulado que secreta sustancias cuya función se desconoce ([Kumar et al. 2010](#), [Seifert et al. 2012](#)). La implicación que tiene el hecho de que la vía de señalización Wnt/ β -catenina esté activa en las células de Leydig es incierta. Se esperaba ver activa la vía de manera más prominente en las células del blastema, co-localizando la presencia de la actividad con las zonas altas en proliferación. Especialmente debido a que durante el desarrollo de la extremidad la vía de señalización Wnt/ β -catenina está activa en el primordio de la extremidad (el análogo al blastema durante el desarrollo embrionario) que es altamente proliferativo ([ten Berge et al. 2008](#)). No es forzoso, sin embargo, que la zona de proliferación y el inductor de proliferación co-localicen espacialmente. El inductor podría estar regulando la proliferación de manera indirecta. Durante la regeneración de la aleta caudal del pez cebra, en donde la vía de señalización Wnt/ β -catenina se requiere para la proliferación del blastema ([Kawakami et al. 2006](#), [Stoick-Cooper et al. 2007](#)), se ha demostrado que dicha vía de señalización no está activa en la zona más proliferativa del blastema, sino en la región no proliferativa donde se cree que regula la proliferación y diferenciación a través de una señalización secundaria ([Wehner et al. 2014](#)). En el caso del ajolote, sin embargo, se debe esclarecer aún si la proliferación celular es regulada, como en el caso del pez cebra, de manera indirecta a través de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.

Otra característica que poseen las células de Leydig es que éstas expresan la proteína aAG en el epitelio de la extremidad del ajolote en regeneración y en el epitelio de la región de la extremidad que no se encuentra regenerando ([Kumar et al. 2010](#)). Como se mostró en este trabajo, la marca del anticuerpo contra β -catenina activa está presente en este mismo tipo celular también en el epitelio de la extremidad en regeneración y en el epitelio de la región que no se encuentra regenerando. Aunado a esto, la proteína nAG, el ortólogo de la proteína aAG en tritones que se expresa en las células glandulares, demostró controlar la proliferación celular, como parece hacerlo también la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Más aún, nAG es capaz de rescatar la regeneración en extremidades denervadas ([Kumar et al. 2007](#)). Se debe esclarecer aún si es simplemente una coincidencia que tanto nAG-aAG como la vía de señalización Wnt/ β -catenina puedan activar la proliferación y estén presentes en las células glandulares, o si hay una relación entre estas dos. También sería interesante evaluar si hay actividad de Wnt/ β -catenina en las células glandulares de los tritones, donde se expresa nAG. ([Kumar et al. 2010](#)).

Con la finalidad de determinar el efecto que tiene la desregulación de la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes momentos a lo largo del proceso de regeneración, usamos una sustancia química conocido comercialmente como agonista de Wnt. Aunque no se sabe concretamente cómo funciona a nivel celular este fármaco, se sugiere que su efecto es a nivel de receptor pues, al colocar el antagonista Dkk-1 (el cual se une y secuestra al co-receptor LRP5/6, inhibiendo de esta manera la transducción de señal inducida por la unión del ligando) junto con el fármaco agonista de Wnt en un cultivo de células inmortalizadas de endotelio cerebral humano, el efecto que se observó consistió en la localización perinuclear de β -catenina y no en la localización nuclear que se observa cuando se coloca únicamente el agonista de Wnt ([Lim et al. 2008](#)).

Debido a que no había certeza sobre si este fármaco realmente fungía como agonista durante la regeneración de la extremidad del ajolote, se realizaron diversos

experimentos para corroborar su funcionalidad en este sistema. Uno de ellos consistió en una inmunofluorescencia con el anticuerpo contra β -catenina activa y el otro en la evaluación de la expresión de los genes blancos de dicha vía. Ambos resultados mostraron que el fármaco funcionaba adecuadamente en el sistema. El efecto observado del fármaco sobre el organismo parece ser el de sobre activar más que de activar ectópicamente (fig. 4.4). Es posible que esto se deba a que sólo las células con receptores a Wnt fueran las que responden a la adición del fármaco y que sólo en el epitelio hubiera dichos receptores. Por otro lado, también, el hecho de que no se observe actividad ectópica podría deberse a que células como las del blastema (en donde no se observa marca positiva para el anticuerpo contra β -catenina), no sean receptivas al fármaco, más que al hecho de que el fármaco no pudiera penetrar, pues por ejemplo, al colocar perlas con el fármaco dentro del blastema no se observan diferencias en la regulación del gen *sox9* (fig. 4.16), cuando ya se ha reportado que este gen es regulado negativamente por la vía de señalización Wnt/ β -catenina ([ten Berge et al. 2008](#)).

Al tratar a los animales durante diferentes ventanas de tiempo con la droga, se determinó que existen dos momentos en los cuales al añadir el agonista de la vía de señalización Wnt/ β -catenina se tienen efectos negativos sobre la regeneración. Uno es durante la etapa de curación de la herida, antes de que el blastema se forme (a las 0 y 24 horas de tratamiento post amputación) y el otro es después de que el blastema se ha formado, pero antes de que comience el proceso de morfogénesis (a los 10 y 12 dpa). El hecho de que en ciertas ventanas de tratamiento haya efecto, y en otras no, llama la atención pues, como se aprecia en las inmunohistoquímicas, se puede observar que hay actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina a lo largo de todo el proceso de regeneración (fig. 4.2). Esto nos haría suponer que, al colocar el fármaco en cualquier momento a lo largo del proceso de regeneración, estaríamos teniendo el efecto de sobre-activación. Sin embargo, no siempre se obtuvieron fenotipos en los cuales la regeneración se viera afectada. Esto podría deberse probablemente, a que en los momentos en los que no hay efecto, los componentes que están río abajo en la cascada molecular (Hh, TGF- β , Fgf, o algún

otro) de la vía de señalización no son sensibles al incremento de la actividad de la vía o no están presentes, no pudiendo de esta manera concluir un efecto notorio. Otra opción podría ser que sí hubiera algún efecto, como el incremento en la proliferación (como se observa a los 7 dpa, fig. 4.13 y 4.14) pero que éste no repercutiera de manera permanente o global en el proceso de regeneración.

También se analizó cómo evolucionaba la regeneración en animales tratados con el agonista de Wnt antes de la formación del blastema (en la ventana de tratamiento de 24 hpa), de tal manera que se pudiera determinar qué eventos se veían afectados por el tratamiento. Lo primero que se observó es que parece haber un retraso en el proceso de curación de la herida. Este resultado concuerda con otros sistemas de curación de heridas en donde la vía de señalización Wnt/ β -catenina se observa más activa en heridas crónicas. Además, en un cultivo organotípico de piel humana, el tratamiento con LiCl (un activador de la vía Wnt/ β -catenina) ocasiona un retraso en la curación de la herida y este mismo tratamiento en un ensayo de herida por rasgadura, inhibe la migración de los queratinocitos, incluso cuando el cultivo es tratado con el estimulante de migración EGF ([Stojadinovic et al. 2005](#)).

Otra observación que se tuvo durante la evolución de la regeneración de la extremidad en animales tratados en la ventana de tiempo de 24 hpa, fue que, a pesar de la inhibición de la regeneración de la extremidad, el proceso de desdiferenciación estaba presente, aunque, probablemente debido al retraso del proceso de curación de la herida, se encontraba desfasado comparado con el control. El hecho de que la desdiferenciación esté presente en ventanas de tiempo donde la regeneración se ve inhibida y que, por otro lado, en la ventana de tratamiento donde comienza la desdiferenciación (tratamiento 48 hpa) la regeneración no se vea afectada, sugiere que el tratamiento con el fármaco agonista de Wnt no afecta la desdiferenciación. Se ha reportado en el pez cebra que la desdiferenciación no se ve afectada por FGF ([Knopf et al. 2011](#)) y en los tritones parece ser que el tratamiento con ciclopamina (inhibidor de la vía de señalización de Hh) tampoco inhibe la desdiferenciación, ya que al tratar a los animales con este

fármaco no se observan diferencias en ese aspecto en comparación con el control ([Singh et al. 2012](#)), sugiriendo que tampoco estas dos vías de señalización están involucradas en este proceso.

No se observó, sin embargo, que se formara un blastema durante el estudio de la evolución de la regeneración en animales tratados con el agonista de Wnt, demostrando que la regeneración de la extremidad se ve afectada por la falta de la formación de esta estructura.

Posteriormente analizamos a qué se debía esta falta de formación de blastema. Interesantemente, el hecho de que haya un proceso de curación de la herida y de desdiferenciación, pero una ausencia de formación de blastema, se presenta también cuando las extremidades son denervadas y amputadas ([Salley & Tassava 1981](#), [Kumar et al. 2007](#)). Por lo tanto, quisimos verificar el estado de innervación de las extremidades tratadas con el agonista de Wnt durante el proceso de curación de la herida (24 hpa). Lo que se observó fue que, a diferencia del control, las extremidades amputadas no están innervadas a los 3 dpa y esta innervación no se presenta tiempo después, pues en esta misma ventana de tratamiento, los muñones de las extremidades de los ajolotes de 7 dpa aún no están innervados. No sabemos a qué se deba la inhibición en la regeneración de los nervios ocasionada por el fármaco. Por lo general, se reporta que la activación de la vía tiene un efecto positivo sobre la regeneración neuronal ([Patel et al. 2017](#)). Podría ser que la inhibición de la regeneración en los nervios sea un efecto secundario de algún otro proceso que no se llevó a cabo de la manera adecuada, como la epitelialización de la herida.

El estudio de la innervación se efectuó mediante una inmunofluorescencia con un anticuerpo contra tubulina acetilada. Dicho anticuerpo, además de marcar los nervios, también dio positivo para la región en donde están ubicadas las células de Leydig. No se sabe si esto se debe a que las células de Leydig tienen tubulina acetilada o a que éstas están innervadas.

El proceso de curación de la herida se vio afectado por el tratamiento con el agonista de Wnt en dos ventanas de tiempo (0 y 24 hpa) y una ventana no mostró afectación (48 hpa). Esto sugiere que algún evento relevante debe estar ocurriendo entre estos dos periodos que hace la diferencia entre ser o no ser afectado por un incremento en la actividad vía de señalización Wnt/ β -catenina. Una posibilidad podría consistir en que una vez que se ha logrado la innervación de la extremidad (probablemente antes de los 3 dpa ([Satoh et al. 2008](#))), la desregulación en la activación en la vía de señalización Wnt/ β -catenina ya no afecta la regeneración de la extremidad.

Otra observación que se hizo en este trabajo es que las extremidades que no regeneran forman tejido fibrótico en el muñón. Coincidentemente, el tejido fibrótico también se forma en extremidades denervadas que usualmente no poseen la capacidad de regenerar. Sin embargo, en los urodelos, los nervios de extremidades denervadas también llegan a regenerar. Si esto sucede antes de que se forme tejido fibrótico, la extremidad puede regenerar ([Salley & Tassava 1981](#), [Kumar et al. 2007](#)). Notablemente en nuestro trabajo no todas las extremidades que fueron tratadas en la ventana de tiempo de curación de la herida (0 dpa) fueron afectadas por el tratamiento (2/4), lo que podría deberse a que el nervio alcanza a recuperarse antes de que se forme una cicatriz.

Se ha establecido en varias ocasiones que tanto durante la regeneración, como durante el desarrollo de las extremidades, la vía de señalización Wnt/ β -catenina afecta la proliferación ([Kawakami et al. 2006](#), [Stoick-Cooper et al. 2007](#), [ten Berge et al. 2008](#)). En este trabajo quisimos comprobar si en nuestro sistema, el fármaco también era capaz de incrementar la proliferación. Por lo cual se aplicó el tratamiento con el agonista de Wnt en la etapa de formación de blastema. Efectivamente, el agonista de Wnt fue capaz de incrementar la proliferación celular. Sin embargo, a pesar del incremento en la proliferación, los tratamientos dados en las ventanas de tiempo que comprendían la etapa de formación del blastema (7, 10 y 12 dpa) no aceleraban el procesos de regeneración, contrario a lo que se ve en la regeneración de la aleta del pez cebra en un mutante del inhibidor de la vía Wnt/ β -

catenina, Axina2 ([Stoick-Cooper et al. 2007](#)). Más aún, dos de las ventanas de tratamiento, 10, 12 dpa tuvieron afectaciones en la regeneración. Mientras que, a los 7 dpa no se presentó más que un leve retraso en el proceso.

También durante la formación del blastema se probó que el fármaco agonista de Wnt es capaz de incrementar la proliferación a pesar de la ausencia de los estímulos de los nervios, que fueron retirados mediante una cirugía de denervación (en esta ventana de tratamiento los nervios ya se han establecido en el muñón).

Como se mencionó anteriormente, tanto la vía de señalización Wnt/ β -catenina, como los nervios, son capaces de inducir la proliferación durante la regeneración de la extremidad ([Petrosky et al. 1980](#), [Brockes 1984](#), [Mescher & Tassava 1975](#), [Kawakami et al. 2006](#), [Stoick-Cooper et al. 2007](#), [Stocum & Cameron 2011](#)). Sin embargo, en este trabajo no queda claro si en los urodelos los nervios y la vía de señalización Wnt/ β -catenina trabajan de manera sinérgica, si hay redundancia en la función de ambos o si uno regula al otro. En el caso de la regeneración de la extremidad de las *Xenopus* juveniles, se ha sugerido que la vía de señalización Wnt/ β -catenina y las señales derivadas de los nervios tienen papeles redundantes durante el inicio de la regeneración de la extremidad como se mencionó en la introducción ([Yokoyama et al. 2011](#)).

Cuando los animales fueron tratados después de que el blastema se formó, pero antes del comienzo del proceso de morfogénesis (10 y 12 dpa), el fenotipo final de la extremidad regenerada presentó varias malformaciones esqueléticas. Dichas malformaciones consistieron principalmente en elementos esqueléticos fusionados, falta de osificación y ausencia de algunos elementos esqueléticos. Aunado a esto, los cortes histológicos revelaron la falta de organización tisular, entre otras cosas. Existen dos mutantes de ratón, uno que expresa CA-LEF, una forma constitutivamente activa de LEF-1, bajo el promotor/enhancer de la colágena de tipo II, y otro que lleva una forma estable de β -catenina (β -catenin^{+/*flox(ex3)*}; Col2a1-Cre), que presentan fenotipos muy similares en el desarrollo de la extremidad a los que se obtuvieron en la regeneración de la extremidad. Alguno de estos son: falta de

organización tisular del esqueleto, falta de articulaciones, inhibición de osificación endocondral y la ausencia de una organización en forma de columnas paralelas de los condrocitos en proliferación, que están presentes en un elemento esquelético normal ([Akiyama et al. 2004](#), [Tamamura et al. 2005](#)). Esto sugiere que, al igual que durante el desarrollo de la extremidad, la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la regeneración de la extremidad debe de ser bien regulada, para que se pueda formar una estructura esquelética adecuada.

Durante la diferenciación condrogénica en la formación esquelética endocondral, Sox9 tiene diferentes papeles de manera sucesiva que procuran la formación adecuada de los elementos esqueléticos ([Akiyama et al. 2002](#)). Por otro lado, está bien documentado que la vía de señalización Wnt/ β -catenina es capaz de inhibir Sox9, consecuentemente afectando el proceso condrogénico ([Akiyama et al. 2004](#), [Day et al. 2005](#), [ten Berge et al. 2008](#)). Debido a esto y al fenotipo que se obtuvo al tratar a los animales después de que el blastema se ha formado, pero antes del proceso de morfogénesis (formación inadecuada de los elementos esqueléticos), esperábamos ver una afectación en la expresión de *sox9*. Sorprendentemente no vimos ningún cambio en un periodo de tratamiento de 24 horas ya sea sumergiendo a los animales o mediante la inserción de perlas. Esto podría deberse a que *sox9* no se ve afectado directamente por el agonista de Wnt. Por ejemplo, podría ser que *sox9* no se viera afectado, pero sí algún otro gen río abajo de *sox9* dentro de la cascada condrogénica, explicando el fenotipo que obtuvimos.

CONCLUSIONES

La vía de señalización Wnt/ β -catenina está activa en las células de Leydig.

La regeneración de la extremidad no se lleva a cabo de manera adecuada al activar la vía de señalización Wnt/ β -catenina en dos momentos diferentes del proceso de regeneración. El primero, al comienzo del proceso de regeneración, antes de la formación del blastema. El segundo, después de la formación del blastema, antes de la morfogénesis.

El tratamiento con el agonista de Wnt causa un efecto irreversible sobre la regeneración y ocasiona la formación de una cicatriz.

El tratamiento con el agonista de Wnt inhibe la formación de un blastema en etapas tempranas de la regeneración de la extremidad, lo que correlaciona con una falta de innervación.

El agonista de Wnt incrementa la proliferación aun en extremidades denervadas.

La activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina ocasiona una desorganización tisular del esqueleto y no afecta la expresión de *sox9* a las 24 h posteriores al tratamiento.

PERSPECTIVAS

A pesar de que en urodelos ya se ha inhibido la vía de señalización Wnt/ β -catenina durante la regeneración de la extremidad, esta inhibición no se ha efectuado en diferentes momentos a lo largo del proceso de regeneración. Esto nos permitiría visualizar cómo se afectan los distintos procesos que se dan a lo largo de la regeneración. Por lo tanto, sería interesante llevar a cabo una inhibición de la vía en distintas ventanas de tiempo a lo largo del proceso de regeneración.

Por otro lado, también sería interesante evaluar si existe una relación entre la vía de señalización Wnt/ β -catenina y la expresión de aAg.

Sería interesante evaluar la relación que guarda la vía de señalización Wnt/ β -catenina con los nervios y la proliferación.

Queda por estudiar si Wnt/ β -catenina controla un centro organizador y si este centro organizador son las células glandulares de la piel.

Además sería importante establecer la relación que tiene la vía de señalización Wnt/ β -catenina con otras vías de señalización como la vía de Hh y de BMPs

REFERENCIAS

- Anakwe K, Robson L, Hadley J, Buxton P, Church V, Allen S, Hartmann C, Harfe B, Nohno T, Brown AM, Evans DJ, Francis-West P. (2003) Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development*. 130:3503–3514.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. (2002) Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*. 16:2813-28.
- Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B. (2004) Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*. 18:1072-87.
- Barrow JR, Thomas KR, Boussadia-Zahui O, Moore R, Kemler R, Capecchi MR, McMahon AP. (2003) Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev*. 17:394-409.
- Brockes JP. (1984) Mitogenic growth factors and nerve dependence of limb regeneration. *Science*. 225:1280-7.
- Brockes JP & Kumanar A. (2008) Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 24:525-49.
- Carlson B.M. (2007). *Principles of Regenerative Biology*. Elsevier Academic Press.
- Carlson BM. (1974) Morphogenetic interactions between rotated skin cuffs and underlying stump tissues in regenerating axolotl forelimbs. *Dev Biol*. 39: 263–285.
- Carlson BM. (1975) The effects of rotation and positional change of stump tissues upon morphogenesis of the regenerating axolotl limb. *Dev Biol*. 47:269–291.
- Carlson MR, Bryant SV, Gardiner DM. (1998) Expression of Msx-2 during development, regeneration, and wound healing in axolotl limbs. *J. Exp. Zool*. 282: 715–723.
- Chen H, Lun Y, Ovchinnikov D (1998). Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat Genet*. 19:51–55.
- Chimal-Monroy J, Rodriguez-Leon J, Montero JA, Gañan Y, Macias D, Merino

- R, Hurlle JM. (2003) Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol.* 257:292-301.
- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 8:739-50.
- Dent JN. (1962) Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J. Morphol.* 110: 61–77.
- Garciadiego-Cázares D, Rosales C, Katoh M, Chimal-Monroy J. (2004) Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton. *Development.* 131:4735-42.
- Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. (2013) The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* 11:611-20.
- Gerling S, D' Haese J, Greven H. (2012) Number and distribution of Leydig cells (LC) in the epidermis of the growing axolotl, *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Urodela). *Vertebrate Zoology.* 62, 97-111.
- Goss RJ. (1956) Regenerative inhibition following limb amputation and immediate insertion into the body cavity. *Anat. Rec.* 126:15–27.
- Grim M & Carlson BM. (1974) A comparison of morphogenesis of muscles of the forearm and hand during ontogenesis and regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Z Anat Entw.Gesch.* 1445:137-167.
- Guimond JC, Lévesque M, Michaud PL, Berdugo J, Finnson K, Philip A, Roy S.(2010) BMP-2 functions independently of SHH signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs. *BMC Dev Biol.* 10:15
- Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y. (2004) Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev.* 18:2404-17
- Hay ED. (1961) Fine structure of an unusual intracellular supporting network in the Leydig cells of *Ambystoma* epidermis. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology.* 10: 457-463
- Hill TP, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. (2006) Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning. *Development.* 133:1219-29.

IHC World, LLC. (2003-2011) Masson Trichrome Staining Protocol for Collagen Fibers. http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/masson_trichrome.htm

Iten LE & Bryant SV. (1973) Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: length, rate, and stages. *Wilhelm Roux' Arch.* 173:263–282.

Jaral MS. (1989) Fine structure of the epidermal Leydig cells in the axolotl *Ambystoma mexicanum* in relation to their function. *J Anat.* 167, 95–102.

Kawakami Y, Capdevila J, Buscher D Itoh T, Rodríguez Esteban C, Izpisúa Belmonte JC. (2001) WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell.* 104:891–900.

Kawakami Y, Rodríguez Esteban C, Raya M, Kawakami H, Martí M, Dubova I, Izpisúa Belmonte JC. (2006) Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev.* 20:3232-7.

Knopf F, Hammond C, Chekuru A, Kurth T, Hans S, Weber CW, Mahatma G, Fisher S, Brand M, Schulte-Merker S, Weidinger G. (2011) Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Dev Cell.* 20:713-24.

Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH, Tanaka E (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature.* 460:60–65.

Kumar, A. Godwin JW, Gates PB, Garza-Garcia AA, Brockes JP. (2007) Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science.* 318: 772–777

Kumar A, Nevill G, Brockes JP, Forge A. (2010) A comparative study of gland cells implicated in the nerve dependence of salamander limb regeneration. *J Anat.* 217:16-25.

Kumar A & Brockes JP. (2012) Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration. *Trends Neurosci.* 35:691-9

Lee MH, Koria P, Qu J, Andreadis ST. (2009) JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions. *FASEB J.* 23:3874-83.

Lévesque M, Villiard E, Roy S. (2010) Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 314:684-97

Lim JC, Kania KD, Wijesuriya H, Chawla S, Sethi JK, Pulaski L, Romero IA, Couraud PO, Weksler BB, Hladky SB, Barrand MA. (2008) Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J Neurochem.* 106:1855-65.

- Luna-Ulloa LB, Hernández-Maqueda JG, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. (2011) Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis*. 32:1615-24.
- Maden M. (1978) Neurotrophic control of the cell cycle during amphibian limb regeneration. *J Embryol Exp Morph* 48:169–175.
- Mescher AL. (1976) Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *J. Exp. Zool.* 195:117–128.
- Mescher AL & Tassava RA. (1975) Denervation effects on DNA replication and mitosis during the initiation of limb regeneration in adult newts. *Dev Biol.* 44:187–197.
- Mullen LM, Bryant SV, Torok MA, Blumberg B, Gardiner DM. (1996) Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development*. 122:3487–3497.
- Munaim SI & Mescher AL. (1986) Transferrin and the trophic effect of neural tissue on amphibian limb regeneration blastemas. *Dev Biol.* 116:138–142.
- Muneoka K, Holler-Dinsmore G, Bryant SV. (1986) Intrinsic control of regenerative loss in *Xenopus laevis* limbs. *J. Exp. Zool.* 240:47–54.
- Munsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA McMahon AP, Lassar AB. (1995) Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* 9:2911–2922.
- Nusse R. (2012) Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:4.
- Parr BA & McMahon AP. (1995) Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 374:350–353.
- Patel AK, Park KK, Hackman AS. (2017) Wnt signaling promotes axonal regeneration following optic nerve injury in the mouse. *Neuroscience*. 343:372-383.
- Petrosky NS, Tassava RA, Olsen CL. (1980) Cellular events in denervated limb stumps of *Ambystoma* larvae during re-innervation and subsequent regeneration. *Experientia*. 36:601-3.
- Rao N, Jhamb D, Milner DJ, Li B, Song F, Wang M, Voss SR, Palakal M, King MW, Saranjami B, Nye HL, Cameron JA, Stocum DL. (2009) Proteomic analysis of blastema formation in regenerating axolotl limbs. *BMC Biol.* 7:83.

- Repesh LA & Oberpiller JC. (1978) Scanning electron microscopy of epidermal cell migration in wound healing stage of regeneration in the adult newt, *Notopharum viridaescens*. Am J Anat. 151:539-556.
- Repesh LA & Oberpiller JC. (1980) Ultrastructural studies on migrating epidermal cells during the wound healing stage of regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. Am J Anat. 159:187-208.
- Salley JD & Tassava RA. (1981) Responses of denervated adult newt limb stumps to reinnervation and reinjury. J Exp Zool 215:183-9.
- Sandoval-Guzmán T, Wang H, Khattak S, Schuez M, Roensch K, Nacu E, Tazaki A, Joven A, Tanaka EM, Simon A. (2014) Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. Cell Stem Cell. 14:174-87.
- Satoh A, Gardiner DM, Bryant SV, Endo T. (2007) Nerve-induced ectopic limb blastemas in the Axolotl are equivalent to amputation-induced blastemas. Dev Biol. 312:231-44.
- Satoh A, Graham GM, Bryant SV, Gardiner DM. (2008) Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Dev Biol. 319:321-35.
- Seifert AW, Monaghan JR, Voss SR, Maden M. (2012) Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. PLoS One. 7:e32875
- Singer M. (1952) The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. Q Rev Biol. 27:169–200.
- Singh BN, Doyle MJ, Weaver CV, Koyano-Nakagawa N, Garry DJ. (2012) Hedgehog and Wnt coordinate signaling in myogenic progenitors and regulate limb regeneration. Dev Biol. 371:23-34.
- Smith AR, Lewis JH, Crawley A, Wolpert L. (1974) A quantitative study of blastemal growth and bone regression during limb regeneration in *Triturus cristatus*. J Embryol Exp Morphol. 2:375-90
- Später D, Hill TP, O'sullivan RJ, Gruber M, Conner DA, Hartmann C. (2006) Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. Development. 133:3039-49.
- Stocum DL & Dearlove GE. (1972) Epidermal- mesodermal interaction during morphogenesis of the limb regeneration blastema in larval salamanders. J Exp Zool. 181:49–62.

- Stocum DL. (1979) Stages of forelimb regeneration in *Ambystoma maculatum*. *J Exp Zool.* 209:395–416.
- Stocum DL & Cameron JA (2011) Looking proximally and distally: 100 years of limb regeneration and beyond *Dev Dyn.* 240:943-68.
- Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Riehle KJ, Hubbert C, Major MB, Fausto N, Moon RT. (2007) Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development.* 134:479-89.
- Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, Merchant A, Galiano RD, Tomic-Canic M. (2005) wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol.* 167:59-69.
- Suzuki M, Yakushiji N, Nakada Y, Satoh A, Ide H, Tamura K. (2006) Limb regeneration in *Xenopus laevis* froglet. *ScientificWorldJournal.* 1:26-37.
- Takeuchi JK, Koshiba-Takeuchi K, Suzuki T, Kamimura M, Ogura K, Ogura T. (2003) Tbx5 and Tbx4 trigger limb initiation through activation of the Wnt/Fgf signaling cascade. *Development.* 130:2729-39.
- Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. (2005) Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem.* 280:19185-95.
- Tanaka M. (2013) Molecular and evolutionary basis of limb field specification and limb initiation. *Dev Growth Differ.* 55:149-63
- Tank PW. (1976) A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J Morphol.* 150:117-128.
- Tank PW. (1978) The failure of double-half forelimbs to undergo distal transformation following amputation in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J Exp Zool.* 204:325-36.
- Tank PW & Holder N. (1978) The effect of healing time on the proximodistal organization of double-half forelimb regenerates in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Dev Biol.* 66:72-85.
- Tassava RA & McCullough WD. (1978) Neural control of cell cycle events in regenerating salamander limbs. *Am Zool.* 18:843–854.

- Tassava RA & Garling DJ. (1979) Regenerative responses in larval axolotl limbs with skin grafts over the amputation surface. *J. Exp. Zool.* 208:97–110.
- Tassava RA & Mescher AL. (1975) The roles of injury, nerves and the wound epidermis during the initiation of amphibian limb regeneration. *Differentiation.* 4: 23–24.
- ten Berge D, Brugmann SA, Helms JA, Nusse R. (2008) Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development.* 135:3247-57.
- Thornton CS. (1938) The histogenesis of muscle in the regenerating forelimb of larval *Ambystoma punctatum*. *J Morph.* 62:17–46.
- Thornton CS. (1957) The effect of apical cap removal on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *J. Exp. Zool.* 134:357–381.
- Thornton CS. (1960) Influence of an eccentric epidermal cap on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *Dev Biol.* 2:551–569.
- Thornton CS & Thornton MT. (1965) The regeneration of accessory limb parts following epidermal cap transplantation in urodeles. *Experientia.* 21:146–148.
- Vinarsky V, Atkinson DL, Stevenson TJ, Keating MT, Odelberg SJ (2005). Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. *Dev. Biol.* 279: 86–98
- Wehner D, Cizelsky W, Vasudevaro MD, Ozhan G, Haase C, Kagermeier-Schenk B, Röder A, Dorsky RI, Moro E, Argenton F, Kühl M, Weidinger G. (2014) Wnt/ β -catenin signaling defines organizing centers that orchestrate growth and differentiation of the regenerating zebrafish caudal fin. *Cell Rep.* 6:467-81.
- Yang EV, Gardiner DM, Carlson MR, Nugas CA, Bryant SV. (1999) Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Dev. Dyn.* 216:2–9.
- Yang Y. (2003) Wnts and wing: Wnt signaling in vertebrate limb development and musculoskeletal morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 69:305-17
- Yang Y. (2012) Wnt signaling in development and disease *Cell Biosci.* 2:14
- Yokoyama H, Ogino H, Stoick-Cooper CL, Grainger RM, Moon RT. (2007) Wnt/ β -catenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration. *Dev Biol.* 306:170-8

Yokoyama H, Maruoka T, Ochi H, Aruga A, Ohgo S, Ogino H, Tamura K. (2011) Different requirement for Wnt/ β -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus*. PLoS One. 6:e21721.