



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**El RAR β regula la diferenciación del cartílago y la morfogénesis
de la aleta en regeneración de *Polypterus senegalus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

GUTIÉRREZ LARA ODÓN ELISEO

ASESOR:

Dr. JESÚS CHIMAL MONROY

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

El RAR β regula la diferenciación del cartilago y la morfogénesis de la aleta en regeneración de *Polypterus senegalus*.

Que presenta el pasante: Odón Eliseo Gutiérrez Lara

Con número de cuenta: 309090302 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Abril de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Jesús Chimal Monroy	
VOCAL	QFB. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Lucero Paniagua García	
2do. SUPLENTE	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADEZCO:

A mi familia por su apoyo incondicional, a mi padre que hasta el día de hoy me deja grandes enseñanzas a pesar de que han pasado más de diez años de su partida, siempre está presente. A mi madre quien ha mostrado una gran fuerza y ha sabido salir delante.

A mis hermanas, Brey quién siempre me ha apoyado y me ha demostrado que con esfuerzo y constancia se cumplen las metas, y Lupita quien me recuerda los sueños que tuve de niño y me alienta a seguir en la batalla para conseguirlos.

A mi tío Luis que sin su apoyo el camino hubiese más difícil para llegar hasta acá.

A todos aquellos compañeros de este viaje que en algún momento de me tendieron la mano y con quienes he compartido buenos y no tan buenos momentos, quienes hoy en día puedo llamar amigos: Raisa, Andy, Karina, Nacho, Riquelme, Sandy haciendo una mención especial a Jimena.

A mis compañeros de laboratorio: Marcia, Brianda, Donovan, Alejandro, Jess, Valentina, Liz, Giselle y Faviel quienes me brindaron su apoyo y con quienes además de compartir conocimiento, compartimos momentos divertidos.

A mis profesores y sinodales: QFB Nydia Berenice González Angeles, M. en C. Maritere Domínguez Rojas, M. en C. María Lucero Paniagua García y LBD Rosa María de los Angeles López Cabrera, por su tiempo y dedicación.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Dr. Jesús Chimal Monroy por abrirme las puertas de su laboratorio, sus enseñanzas y por darme la confianza y el apoyo de desarrollar este trabajo.

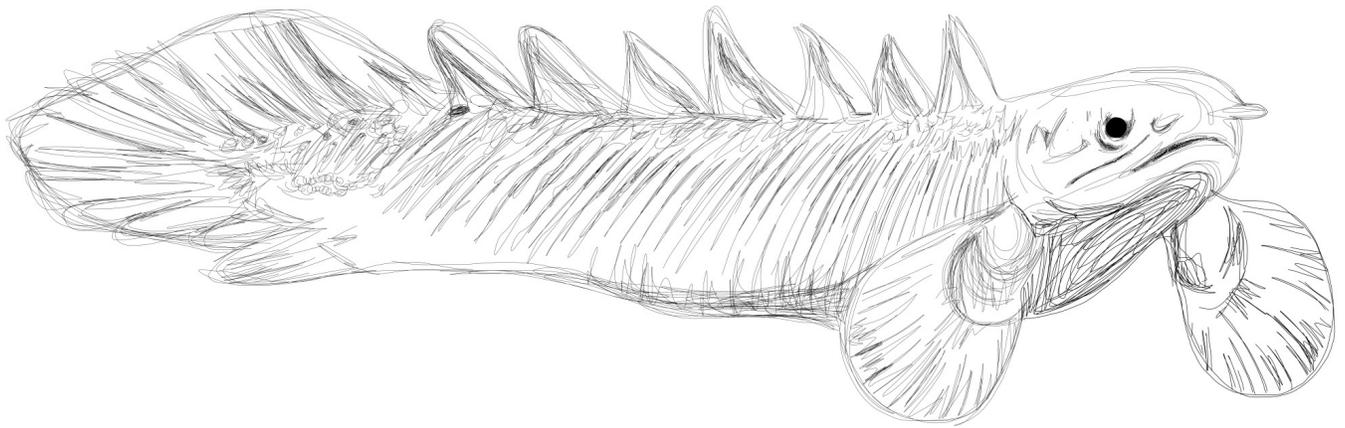
A la UNAM por brindarme una educación de calidad y que sin duda marcó mi vida desde el momento que ingresé al CCH Azcapotzalco y FES Cuautitlán.

Y gracias a todos ellos ha llegado este momento.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM bajo la asesoría del
Dr. Jesús Chimal Monroy.



Homenaje a *Polyterus senegalus*.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Definiendo la regeneración.....	1
La regeneración mediada por células troncales	1
Regeneración por auto-renovación o renovación tisular	2
Morfalaxis	3
Epimorfosis	3
Regeneración de extremidades	6
El ácido retinoico durante la regeneración de extremidades	7
Vía de señalización del ácido retinoico	8
¿Qué es el ácido retinoico?.....	8
Síntesis y fuentes de AR.....	9
Degradación de AR.....	10
Regulación de genes por AR.....	10
Ácido retinoico durante el desarrollo embrionario.....	11
Genes Hox.....	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
General	13
Particulares	14
MÉTODOS Y MATERIALES	14
Cirugía y tratamiento con fármacos.....	14
Tinción de esqueleto	16
Extracción de RNA y PCR	16
RESULTADOS	20
Etapas de regeneración	20
Expresión de <i>Raldh2</i> y <i>Cyp26a1</i> durante la regeneración de la aleta.....	20
Expresión de genes <i>Hox</i> durante la regeneración de la aleta	23
Activación e inactivación del RAR β produce alteraciones en aletas regeneradas	25
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIÓN	34
REFERENCIAS	35
ABREVIATURAS	38

INTRODUCCIÓN

Definiendo la regeneración

Uno de los fenómenos que ha inquietado a los investigadores desde la antigüedad es el proceso de la regeneración, la cual es definida como un fenómeno biológico que consiste en la restauración o reemplazo de órganos o estructuras complejas, e inclusive de organismos completos a partir de fragmentos cuando los organismos han sido dañados o amputados (Chimal-Monroy, Correa-Gallegos, & Galván-Hernández, 2011).

Uno de los pioneros en el estudio de la regeneración fue René-Antoine Réaumur quien es recordado por la investigación sobre la regeneración de las extremidades de los cangrejos que presentó a la Academia de Ciencias de París en 1712. Años más tarde Abraham Trembley realizó estudios en hidras lo cual dejó una serie de datos importantes sobre la regeneración (Dinsmore, 2007).

Otro personaje importante en la historia de la regeneración es Thomas Hunt Morgan, quien fue uno de los científicos que acuñó diversos términos que se siguen utilizando a la fecha para poder comprender mejor el proceso de regeneración. Basándose en observaciones de Wilhelm Roux en las que menciona que hay dos procesos regenerativos: mediante la proliferación y mediante el reordenamiento, Morgan sugirió en 1901 adoptar términos que reflejaran dichas ideas, por lo que denominó al primer proceso como “epimorfosis” y el segundo como “morfalaxis”. Para ello Morgan definió de forma general a la epimorfosis como un proceso que involucra la proliferación celular para la formación de una estructura con un microambiente, a la cual posteriormente se le llamó blastema. Por otro lado, la morfalaxis fue definida como un proceso a partir de la remodelación del material existente. Cabe destacar que ambos procesos se encuentran presentes en la mayoría de los casos (Chimal-Monroy et al., 2011).

Hoy en día se puede decir que la regeneración sucede a través de cuatro mecanismos principales, (regeneración mediada por células troncales, regeneración compensatoria, morfalaxis y epimorfosis) que pueden estar presentes al mismo tiempo.

La regeneración mediada por células troncales

Este tipo de regeneración se caracteriza porque debe haber una fuente de células troncales. Las células troncales son aquellas células que conservan la capacidad de renovarse a sí mismas, así como dar origen células más especializadas. Para que una célula pueda ser denominada trocal debe cumplir con dos características: auto-renovación, es

decir capacidad de pasar por numerosos ciclos de células en división manteniendo un estado indiferenciado y potencia ilimitada, esto es capacidad de diferenciarse a cualquier tipo de célula madura (Young, 2011).

Las células madre pueden ser unipotentes, multipotentes, pluripotentes o totipotentes, dependiendo de la cantidad de tipos de células a las que puedan dar lugar, es decir, del nivel de restricción en su potencialidad, siendo las células troncales totipotenciales aquellas que además de dar origen a todas las células del organismo dan origen a tejido extraembrionario, como lo es la placenta (Jaenisch & Young, 2008).

Un ejemplo característico es el que sucede con la médula ósea a partir de cual se da un reemplazo constante de las células sanguíneas. Otros ejemplos donde se ha señalado este mecanismo es durante el reemplazo del epitelio intestinal y de la epidermis, que ocurre debido a que las células troncales residentes reciben señales que les advierten deben comenzar el proceso de diferenciación celular (Chimal-Monroy et al., 2011).

Regeneración por auto-renovación o renovación tisular

En mamíferos adultos, múltiples tejidos incluidos la piel, el estómago, los intestinos y el hígado se encuentran en un estado de regeneración permanente; las células más viejas se desprenden constantemente, y el tejido se regenera constantemente a partir de células madre residentes. Este fenómeno de "renovación tisular" fue apreciado por Leblond en 1956, sin embargo, el mecanismo aún no está totalmente claro (Clevers, Loh, & Nusse, 2014).

Este tipo de regeneración se caracteriza por la proliferación constante de células diferenciadas hasta retomar el tamaño original del órgano afectado; la peculiaridad de este proceso es que las células que proliferan no lo hacen a partir de células troncales o de un blastema (Chimal-Monroy et al., 2011).

El hígado es uno de los órganos con mayor capacidad regenerativa y precisamente lo hace a través de este mecanismo. Tal parece que esto es sabido desde la antigüedad ya que según la mitología griega Zeus castigó a Prometeo encadenándolo a una roca y haciendo que un águila comiera cada día una porción de su hígado, sin embargo este se recuperaba por la noche lo que resultó en un suministro continuo y eterno de alimento (Gilbert, 2000).

La pérdida de tejido hepático puede suceder por infecciones virales, ingesta de toxinas, así como por un procedimiento quirúrgico (Hepatectomía parcial), posteriormente aparece una respuesta inflamatoria que elimina desechos de tejido, seguido de una regeneración o auto renovación. El hígado regenera a partir de tejidos existentes y las células que se encuentra ahí no se desdiferencian cuando reingresan al ciclo celular, es decir, retienen su identidad celular y su funcionalidad. Este tipo de proliferación se ha

asociado con la fase de iniciación de hepatocarcinogénesis química, sin embargo, en casos normales se detiene una vez el órgano ha llegado a su tamaño original (Gilbert, 2000; Ledda-Columbano, Coni, Simbula, Zedda, & Columbano, 1993; Michalopoulos, 2007).

Morfalaxis

Este tipo de regeneración es definida como la recuperación de parte o todo el organismo caracterizada porque se produce a partir del remodelamiento de los tejidos existentes, resaltado que no hay formación de blastema en la superficie de la herida y la proliferación celular y el crecimiento son poco o nulo.

Tal mecanismo de regeneración es observado en las hidras. La hidra es un género de cnidarios de agua dulce que mide aproximadamente 0,5 cm de largo, dicho organismo tiene la capacidad de regenerarse completamente a partir de un fragmento de tejido y el organismo formado es exactamente igual al de origen, pero de menor tamaño. Cuando una hidra se corta por la mitad, la mitad que contiene la cabeza se regenerará un nuevo disco basal, y la mitad que contiene el disco basal se regenerará una nueva cabeza. Por otra parte, si una hidra se corta en varias porciones, las porciones medias regenerarán ambas partes faltantes, es decir cabezales y discos basales en sus extremos correspondientes. Después de la regeneración el organismo crece hasta alcanzar su tamaño original (Chimal-Monroy et al., 2011; Gilbert, 2000).

Epimorfosis

Este tipo de regeneración es definida como la recuperación de parte o todo el organismo caracterizada por la formación de una estructura llamada blastema, así como una elevada proliferación celular. Un ejemplo claro de este tipo de regeneración es que se da en la regeneración de extremidades de peces y anfibios, así como en el caso de la regeneración en planarias.

Cuando se amputa la extremidad de una salamandra, las células restantes son capaces de reconstruir la extremidad amputada por completo, con todas sus células dispuestas en el orden correcto. En otras palabras, las nuevas células regeneran sólo las estructuras faltantes y no estructuras de más. Es decir, cuando se amputa una muñeca, sólo se regenera una nueva muñeca y no un nuevo codo. De alguna manera, el miembro "sabe" donde ha sido cortado el eje proximal-distal y es capaz de regenerarse a partir de este (Gilbert, 2000).

Se han encontrado una serie de factores clave en todos los ejemplos conocidos de regeneración epimórfica, que como ya se mencionó se basa en la formación del blastema:

- Formación de una epidermis herida especializada que funciona para atraer células blastomales y mantener la proliferación celular
- Dependencia sobre inervación y exposición a factores neuronales o células de Schwann
- Formación de una matriz extracelular pro-regenerativa
- Despliegue de las principales vías de señalización del desarrollo
- Interacción física de las células desde posiciones antonémicas en el espacio tridimensional
- Reconocimiento de tejido ileso versus nuevo y, por lo tanto, reemplazo de nivel específico de tejido apropiado para generar un órgano completo
- Dependencia de los macrófagos para iniciar la regeneración

En conjunto, estas características contribuyen y respaldan la formación de blastemas, y sin ellas no se producirá la regeneración. (Seifert & Muneoka, 2018)

Ahora bien, dicha estructura llamada blastema que juega un papel importante en este proceso de regeneración, puede observarse casi a simple vista y ha facilitado de alguna manera el estudio del fenómeno, el cual fue descrito en 1789 por Broussonet en goldfish como una especie de excrescencia blanquecina que aparecía alrededor del tercer día sobre el borde de amputación y que se extendía para restaurar la aleta, posteriormente se describió en otras especies, pero de manera concreta ¿Qué es el blastema? La palabra “blastema” proviene del griego *blastos* -brotar y *ma* –resultado, lo que podría entenderse como brotar o retoño. Un blastema es una masa celular heterogénea que se forma transitoriamente en el sitio de la lesión, la cual a través de la migración y la proliferación celular se somete a la morfogénesis para formar el órgano faltante. La morfogénesis es referida a la organogénesis, es decir, la formación de órganos durante el desarrollo embrionario, pero en este caso se lleva a cabo en la etapa adulta. Dicha masa heterogénea de las células se encuentra cubierta por la denominada como epidermis de la herida, por lo tanto, la definición de blastema incluye este componente (Seifert & Muneoka, 2018).

El blastema es una estructura con un microambiente compuesta de células indiferenciadas proliferantes cubiertas por la epidermis que permite y caracteriza el proceso de regeneración por epimorfosis (Pfefferli & Jaźwińska, 2015). El origen de esta estructura aún no es totalmente claro, pero se sabe que el blastema surge por la migración y proliferación de fibroblastos seguido de osteoblastos desdiferenciados.

Se han descrito una serie de pasos mediante los cuales se da paso a la formación de blastema en las extremidades de urodelos en regeneración los cuales se pueden subdividir en tres fases superpuestas: hemostasia-reepitelización, histólisis-desdiferenciación y migración-acumulación de células blastema.

La histólisis refiere a la pérdida de la organización de un tejido debido a la degradación enzimática de la matriz extracelular. Todos los tejidos subyacentes a la epidermis herida

experimentan histólisis que involucra la degradación de la matriz extracelular y desorganización tisular, lo que produce la liberación de células dérmicas individuales, células de Schwann de los nervios periféricos y células esqueléticas de su matriz. La histólisis se logra mediante hidrolasas ácidas y metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Por otro lado, la desdiferenciación es la inversión del estado dado de diferenciación a un estado anterior a través de la reprogramación nuclear, pérdida de estructura y función especializadas. La desdiferenciación es un proceso complejo que implica cambios en el programa de transcripción para suprimir los genes de diferenciación, al mismo tiempo que activa los genes asociados con la troncalidad celular y la remodelación de la estructura interna (Stocum & Rao, 2011).

La capa epidérmica apical (CEA) parece dirigir la migración de las células de blastema para formar la acumulación de blastema debajo de ella.

Eventos tempranos de la regeneración, dentro de las primeras horas, las células epiteliales migran y cubren la superficie dañada, dichas células reciben señales neuronales que conducen a la formación de la CEA, que conduce a la desdiferenciación en los tejidos del muñón dando como resultado células indiferenciadas llamadas células del blastema, que se acumulan alrededor de la superficie de amputación. Posteriormente el blastema formado replica procesos de desarrollo para generar la extremidad amputada.

Se ha visto que la CEA es estructuralmente equivalente a la cresta ectodérmica apical, la cual es una estructura transitoria formada durante el desarrollo de las extremidades en muchas especies. Se encuentra en la epidermis del miembro distal y se cree que favorece la proliferación celular y mantiene las células mesenquimáticas subyacentes en un estado indiferenciado, además de que a medida que se pierde la CEA tal como en el caso de la cresta apical ectodérmica, el brote de la extremidad deja de crecer y comienza a diferenciarse y se han descrito patrones similares de expresión génica en la cresta apical ectodérmica y en la CEA, tales como *fgf-8* y *sp-9* que se expresan en ambas estructuras (Sato, Makanae, & Wada, 2010), (Christensen & Tassava, 2000).

Dicha capa ectodérmica apical es un importante centro organizador de la extremidad, es decir un grupo de células que dirige los destinos de un campo morfogenético. Un campo morfogenético es definido como un grupo de células que se autorregula como un conjunto, es una zona en la que pueden llegar a suceder cambios en el presuntivo destino de las células a causa de la estímulos externos o manipulación (Kerszberg & Wolpert, 2007).

Ahora bien, se sabe que se generan patrones por la autorregulación de los campos, sin embargo, esta sigue siendo una incógnita que se ha pretendido esclarecer desde hace más de un siglo. Wolpert en 1969 propuso la denominada teoría de la información posicional en la cual propone que las células de un campo morfogenético adquieren valores posicionales, tal como sucede en un plano de coordenadas y la posición de cada una de

ellas es interpretada generando patrones espaciales. El valor posicional se refiere a un parámetro o referencia celular de la posición dentro de un campo (Wolpert, 2011).

Regeneración de extremidades

Como ya se mencionó este fenómeno de regeneración se encuentra distribuido en diferentes organismos, sin embargo, dentro del grupo de los vertebrados los peces teleósteos y sobre todo los anfibios urodelos destacan por su gran capacidad para regenerar estructuras complejas como sus extremidades.

El ajolote (*Ambystoma mexicanum*) y otras especies de salamandras tienen la capacidad de regenerar sus extremidades de forma casi perfecta después de haber sido amputadas, por otro lado, las ranas (anfibios anuros) como *Xenopus laevis* también presentan gran capacidad de regenerar sus extremidades pero en su caso se pierde dicha habilidad después de sufrir metamorfosis (Maden & Hind, 2003). En los mamíferos hay estudios en los que se demuestra la regeneración de la punta de los dígitos durante el periodo fetal y hasta en etapas perinatales.

El proceso de regeneración de la extremidad en anfibios y peces conlleva una serie de pasos que permiten que éste suceda. Una vez realizada la amputación del miembro, hay un cierre de la herida ya que la superficie rápidamente es cubierta con células epiteliales y a medida que avanza la regeneración se produce un centro organizador muy similar a la cresta apical ectodérmica que se observa durante el desarrollo embrionario, y de igual forma a partir de esta estructura emanan diversos factores que permitirán la proliferación y morfogénesis de la nueva estructura (Blum & Begemann, 2012; Suzuki et al., 2006). Posteriormente la epidermis ha cubierto la zona de la herida, los tejidos debajo de esta sufren histólisis mediada por metaloproteinasas de la matriz. El siguiente paso es la desdiferenciación celular, es decir que hay una reprogramación de las células para abandonar su estado diferenciado y mientras por un lado hay una baja en la expresión de genes asociados a dicha diferenciación, por otro comienzan a expresarse genes asociados con la proliferación de la zona de progreso de la extremidad embrionaria. Al final de la fase de desdiferenciación, las células mesenquimales que se acumulan ensanchando la zona de la herida dan origen al blastema. Dicha estructura sigue creciendo distalmente hasta completar la regeneración de la extremidad mediada por factores de crecimiento. De manera simultánea a este crecimiento ocurre una rediferenciación de las células, que asombrosamente contienen la información necesaria para poder modelar nuevamente la extremidad (Suzuki et al., 2006).

Como se acaba ver, la regeneración de extremidades en los ajolote y aletas de los peces conlleva una serie de pasos compartidos, sin embargo, la mayoría de los estudios de regeneración en aletas se han llevado a cabo en el pez cebra, en aletas radiadas, por lo

que la extremidad de un ajolote podría parecer más compleja que una aleta debido a su estructura esquelética, así como la presencia de músculo esquelético.

Es aquí donde aparece *Polypterus senegalus*, también conocido como “pez dragón africano” o “Bichir de Senegal”, es el miembro más basal del grupo de los actinopterídeos (peces de aletas radiadas) y se predice que apareció hace más de 400 millones de años, poco después del comienzo del período Devónico, sin embargo estos animales tienen un par de aletas pectorales peculiares con un endoesqueleto sofisticado y prominente musculatura proximal, muy similar a las aletas lobuladas características de los sarcopterídeos (Takeuchi, Okabe, & Aizawa, 2009a).

Cabe mencionar que este pez tiene una asombrosa habilidad para regenerar sus aletas pectorales, la cual sólo es comparable a la regeneración observada en anfibios urodelos y al igual que ellos, posterior a la amputación, forman un blastema a partir del cual surgirá la nueva extremidad, en este caso, aproximadamente 30 días después de la amputación (Cuervo, Hernández-Martínez, Chimal-Monroy, Merchant-Larios, & Covarrubias, 2012a). Cabe destacar que, a diferencia de las salamandras, dichos peces no regeneran sus extremidades con la misma fidelidad ya que se ha observado que amputaciones sucesivas regeneran extremidades con un número de elementos menor al original (Nikiforova & Golichenkov, 2012a).

El ácido retinoico durante la regeneración de extremidades

El estudio de la vía de señalización del ácido retinoico (AR) en la regeneración de extremidades en vertebrados tiene una larga historia, se ha visto que tratamientos con AR durante la regeneración causan defectos en la morfogénesis afectando principalmente el eje próximo distal (Blum & Begemann, 2012).

Cabe destacar que diversas investigaciones han demostrado que, durante la regeneración de extremidades, en modelos como el ajolote, rana y pollo, tratamientos con AR tienen efecto principalmente sobre el autópodo y zeugópodo, interesantemente en *Polypterus senegalus* se han observado efectos parecidos (truncamiento de extremidades y duplicaciones anteroposteriores) a los reportados en las otras especies, por lo que sugieren hay homología de estas aletas con las extremidades de los tetrápodos, **Figura 1** basada en (Cuervo et al., 2012a).

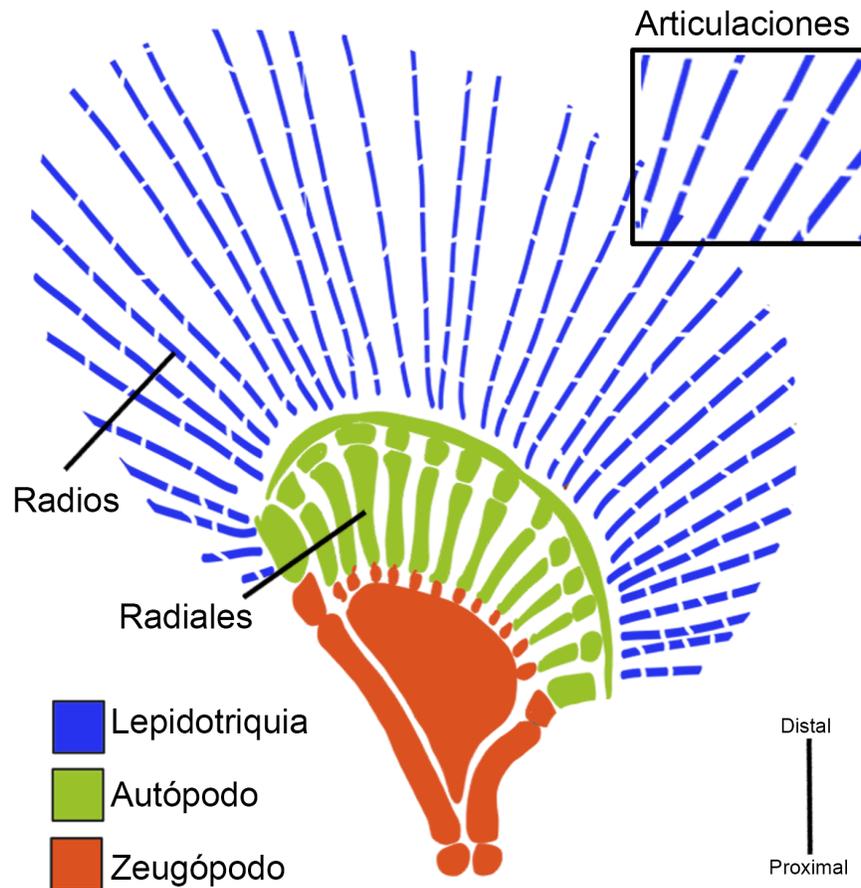


Figura 1. Representación anatómica de la aleta pectoral de *Polypterus senegalus*. La zona más proximal, en color naranja corresponde al zeugópodo, en color verde se muestra el autómodo conformado por radiales mientras que, en la zona más distal, en color azul se muestra lepidotriquia conformada por radios, los cuales se encuentran articulados.

Vía de señalización del ácido retinoico

¿Qué es el ácido retinoico?

El ácido retinoico es el principal metabolito activo de la vitamina A, ambos pertenecientes al grupo de los llamados “retinoides”; es una molécula lipofílica y de bajo peso molecular (300 Da aproximadamente). Dicha molécula controla la expresión de genes a nivel transcripcional y se sabe que juega un papel importante durante el desarrollo embrionario ya que actúa como ligando de los RARs (Receptores de Ácido Retinoico) permitiendo la transcripción de diversos genes, además de actuar como una molécula señalizadora

difundible que controla diversos procesos, mientras que en la edad adulta el AR es esencial para el mantenimiento de la homeostasis epitelial, espermatogénesis, así como el funcionamiento del sistema inmune y cerebro (Cunningham & Duester, 2015).

Se ha visto que durante la embriogénesis el AR juega un papel importante en diversos procesos en la gran mayoría de los tejidos del embrión ya que regula el establecimiento de patrones mediante la formación de un gradiente de su concentración a causa de la expresión de enzimas que lo sintetizan y lo degradan (Rhinn & Dollé, 2012). Por otro lado, los retinoides también pueden ser teratógenos para diversas especies de animales, incluido el humano. Entre los retinoides naturales más potentes se encuentra el “all-trans-retinoic acid”, un metabolito activo de la vitamina A (Liao & Collins, 2008), molécula sobre la cual se abordará este trabajo.

A continuación, se explicará brevemente el metabolismo y mecanismo de acción del AR, como se puede observar en la **Figura 2**, Tomado de (Maden, 2002).

Síntesis y fuentes de AR

En vertebrados el primer paso que llevará a la síntesis del ácido retinoico conlleva una oxidación de retinol a retinaldehído mediado por enzimas alcohol deshidrogenasas (ADHs) o retinol deshidrogenasas (RDHs), enseguida este retinaldehído formado es nuevamente oxidado, esta vez por enzimas retinaldehído deshidrogenasas de las cuales se conocen 3: RALDH1, RALDH2 y RALDH3 (Cunningham & Duester, 2015).

Es preciso recordar que la obtención del ácido retinoico se lleva a cabo de diversas formas, mientras que durante el desarrollo embrionario en especies placentarias la vitamina A es obtenida de forma transplacentaria, en especies ovíparas esta molécula es almacenada en la yema del huevo, cabe señalar que dependiendo de la especie puede tratarse de retinol, retinaldehído o carotenoides. Por otro lado, durante la edad adulta la única forma de obtener el retinol es a través de la dieta ya que no es posible sintetizarla de *novo* (Rhinn & Dollé, 2012), siendo la carne, frutas y verduras los principales alimentos con ácido retinoico. Una vez dentro del cuerpo el retinol se encuentra circulando en la sangre unido a la proteína de unión a retinol 4 (RBP4), posteriormente el complejo retinol-RBP4 es absorbido por los tejidos blanco y se sabe que en algunos casos su entrada a la célula es facilitada por la proteína transmembranal STRAD6, ya dentro de la célula se forma el complejo retinol-CRBP (proteína celular de unión a retinol).

Degradación de AR

Para que los niveles y la distribución de RA sean restringidos de forma correcta en las etapas y sitios adecuados es fundamental la degradación del ácido retinoico y esto se logra a través de su oxidación llevada a cabo por enzimas de la familia citocromo P450, subfamilia 26 (CYP26A1, CYP26B1 y CYP26C1). Estas enzimas catalizan reacciones que convierten el AR en metabolitos más polares que son más fáciles de desechar, entre ellos el 4-oxo-AR y el 4-hidroxi-AR, siendo este último el principal metabolito de deshecho (Cunningham & Duester, 2015).

Regulación de genes por AR

Una vez el ácido retinoico se encuentra en el núcleo ejerce sus funciones a través de los receptores de AR (RARa, RARb y RARg), los cuales se encuentran altamente conservados en los vertebrados, estos a su vez forman un heterodímero con los receptores de retinoides X (RXRa, RXRb y RXRg). Se ha sugerido que los RXR actúan principalmente como proteínas de andamio para facilitar unión del complejo RAR-RXR al ADN. Después de formarse el dímero RAR-RXR éste se une a motivos de DNA conocidos como elementos de respuesta a ácido retinoico (RAREs). Cabe destacar que el heterodímero RAR-RXR se puede unir a los RAREs incluso en ausencia de AR, en este caso para reclutar complejos co-represores evitando la transcripción de genes blanco. Por otro lado, en presencia del ligando, ocurre un cambio conformacional que conduce a la liberación de los co-represores y al reclutamiento de complejos co-activadores. La remodelación de la cromatina produce que se descompacte para facilitar el montaje del complejo que iniciará la transcripción (Cunningham & Duester, 2015; Rhinn & Dollé, 2012).

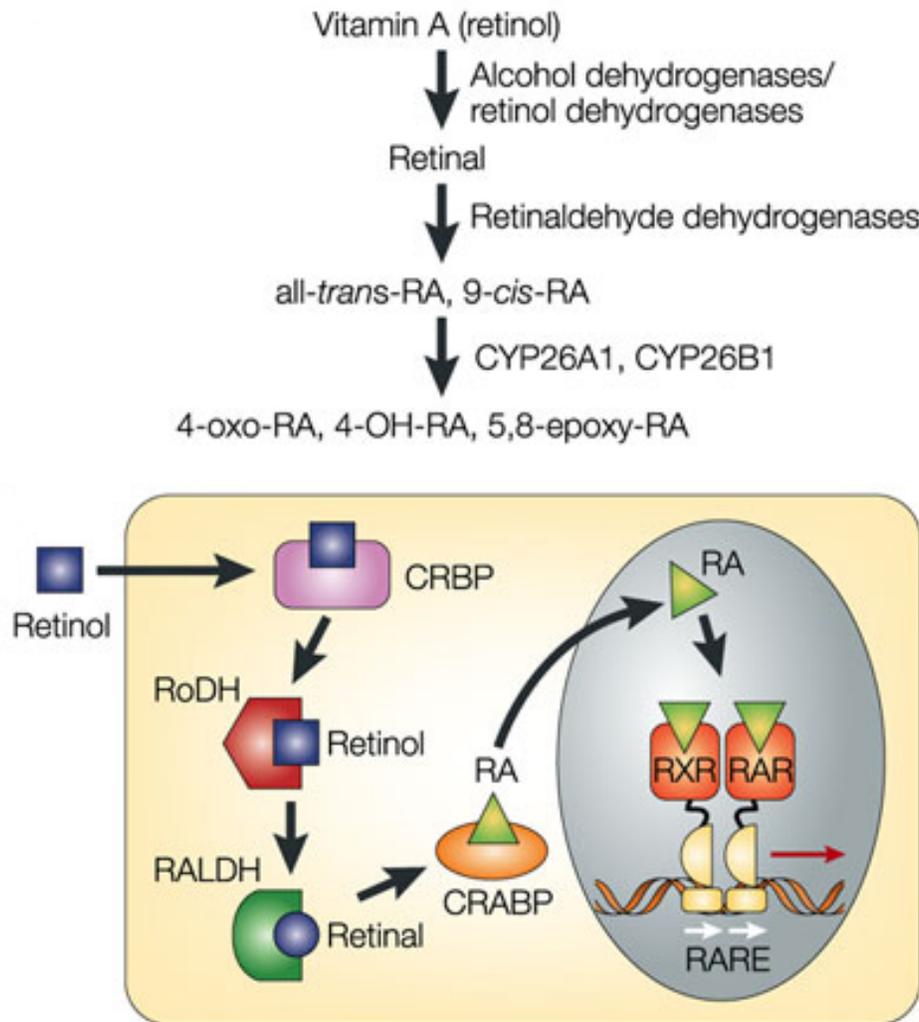


Figura 2. Representación del metabolismo y mecanismo de acción del Ácido Retinoico (AR).

Ácido retinoico durante el desarrollo embrionario

Como ya se mencionó anteriormente, la vía de señalización del AR ha sido implicada en varios procesos de desarrollo. Durante la fase embrionaria temprana, se sabe que los retinoides actúan como un morfógeno, participando en la regulación de diversos procesos biológicos, tales como apoptosis, diferenciación y la especificación del destino celular (Kam, Deng, Chen, & Zhao, 2012).

Esta vía señalización se ha visto implicada en la formación de los ejes embrionarios de diversas especies, hay evidencia que sugiere que interactúa con otras moléculas para regular la formación del eje dorsoventral, en ratones con ausencia de la expresión de Cyp26 presentan ejes secundarios, también se ha reportado que dicha enzima es importante para restringir la expresión de genes durante la formación del eje

anteroposterior. La expresión de Cyp26 es suprimida por la señalización de FGF y Wnt, los cuales participan en la posteriorización durante la gastrulación. Entonces las vías de señalización del AR, FGF y Wnt interactúan como una compleja red para establecer el eje anteroposterior, siendo Cyp26 una molécula que enlaza dichas vías de señalización. Se ha comprobado la participación del ácido retinoico en una variedad de procesos del desarrollo embrionario. En el sistema nervioso se ha visto la participación de esta vía en establecimiento del eje anteroposterior del mismo, así como en la diferenciación neuronal y está asociado con la identidad de los rombómeros. En el páncreas juega un papel esencial en la formación dorsal del páncreas y la diferenciación de células β pancreáticas maduras. En el corazón hay evidencias a cerca de la relación del AR y la formación de progenitores cardíacos, así como la correcta formación de patrones a lo largo de su eje anteroposterior. En el riñón influencia la especificación de las células progenitoras renales.

Ahora bien, para estudiar la vía de ácido retinoico hay que recordar que éste ejerce su actividad a través de los RAR's, así que una manipulación farmacológica podría revelar su función durante la regeneración de la aleta. Esta vía de señalización se encuentra muy conservada, además de que anteriormente ensayos realizados en el laboratorio donde se utilizaron fármacos con actividad específica contra los diferentes RAR (datos no publicados), se hallaron fenotipos interesantes respecto a RAR β durante la regeneración.

Genes Hox

Los vertebrados tienen un eje anteroposterior (AP), mientras que la parte anterior se encuentra la cabeza, la cola se encuentra en el extremo posterior, de forma similar las extremidades guardan una posición y función, es decir, en el caso del humano en la parte más distal del brazo se encuentra la mano, además siempre tiene cinco dedos que se encuentran dispuestos en un orden determinado. Los genes Hox son una familia de factores de transcripción altamente conservados a través de los tres reinos de organismos multicelulares (*animalia*, *plantae* y *fungi*) que controlan la correcta formación del eje AP, es decir, su función consiste en conferir a la célula una identidad espacial o posicional, dichos genes se expresan durante el desarrollo embrionario de una manera coordinada. Se ha descrito que en vertebrados se pueden encontrar de 4 a 8 clusters de genes Hox, se sabe que el pez cebra cuenta con 8 mientras que en el caso de *Polypterus* se han descrito cuatro (Hoxa, Hoxb, Hoxc y Hoxd), (Durstón, 2012).

Los genes Hox son esenciales para el desarrollo de las extremidades, para su crecimiento y organización de las estructuras. Estos genes son importantes para la formación de patrones y ejes primarios durante el desarrollo y regeneración de extremidades. En particular los genes Hox 9-13 están asociados en el modelamiento a lo largo del eje

proximodistal (PD) en la extremidad, (Pineault & Wellik, 2014). Estudios sugieren que los genes Hox están activos en más de un estadio del desarrollo de la extremidad, en estadios tempranos para el reclutamiento de células en la condensación de cartílago y más tarde durante la fase de crecimiento de elementos cartílagos y osificación endocondral, (Rijli & Chambon, 1997).

JUSTIFICACIÓN

La regeneración es un fenómeno que ha inquietado a los humanos desde la antigüedad; en mamíferos la regeneración se encuentra restringida a linajes celulares particulares y el poder recuperar otros tejidos, órganos y estructuras complejas como las extremidades se ha convertido en un desafío. Por ello, el conocimiento que se aporta a partir de los diversos modelos animales es valioso para entender los mecanismos moleculares por los cuales se lleva a cabo la regeneración. *Polypterus senegalus* es un modelo que por su posición filogenética y la homología de sus aletas pectorales con las extremidades de los tetrápodos permitiría inferir sobre dichos mecanismos. Por tales motivos en esta investigación se propone determinar la expresión temporal de genes (*Raldh2*, *Cyp26a1*, *Hoxa11*, *Hoxa13* Y *Hoxd9*) y determinar los efectos de la activación e inactivación de RAR β que se ha visto, participan en la regeneración de extremidades en otros modelos.

HIPÓTESIS

Durante la regeneración de aleta pectoral de *Polypterus senegalus* se expresarán genes involucrados en el desarrollo de la extremidad como son genes involucrados en la regulación del patrón PD (*Hoxa11*, *Hoxa13* Y *Hoxd9*) así como genes de la vía de AR (*Raldh2* y *Cyp26a1*) y el AR generado probablemente actúa a través de RAR β para regular la condrogénesis.

OBJETIVOS

General

Determinación de los fenotipos producidos por la activación e inactivación farmacológica del RAR β , así como evaluar la expresión de genes presentes durante el desarrollo embrionario de la extremidad durante el proceso de la regeneración de aletas pectorales de *Polypterus senegalus*.

Particulares

Determinar la posible función de RAR β durante la regeneración epimórfica en *Polypterus*.

Determinar fenotipos que se obtienen por la exposición exógena al agonista y antagonista de RAR β en una etapa temprana de la regeneración.

Establecer los niveles de expresión de *Raldh2*, *Cyp26a1*, *Hoxa13*, *Hoxa11* y *Hoxd9* a lo largo de la regeneración de la aleta mediante PCR punto final.

MÉTODOS Y MATERIALES

Los peces fueron obtenidos comercialmente en un negocio local. Para los experimentos se utilizaron peces entre 6 y 8 cm de longitud los cuales se mantuvieron en peceras de 40L con agua filtrada, a 28° C y con aeración constante. Se alimentaron diariamente con TetraColor® Tropical Granules. Se hizo limpieza dos veces por semana para remover restos de comida y heces, y cada tres semanas se realizaba un recambio de un tercio del agua. Como se muestra en el diagrama metodológico (**Figura 4**) este trabajo se compone básicamente de dos experimentos, que a continuación se describen con mayor detalle.

Cirugía y tratamiento con fármacos

Los fármacos utilizados para bloquear y activar el RAR β , LE135 y AC55649 respectivamente, se compraron a Tocris Bioscience. Se almacenaron en alícuotas de 10 uL, en concentraciones de 100 mM y 50 mM respectivamente, a -20° C hasta el momento de su uso donde se preparaba la dilución del fármaco a las concentraciones correspondientes (LE135: 50 nM y AC55649: 100 nM).

Para las cirugías los peces se anestesiaron por inmersión en Tricaina 0.05% (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate) hasta que no respondieran a estímulos externos (aproximadamente 10-15'). Se realizó un corte distal sobre el eje antero-posterior (AP) a la altura de la base de los radios (**Figura 3**), posteriormente se dejaron en recuperación en sus peceras correspondientes y se administró el tratamiento al tercer día post amputación. El fármaco se administró en el medio a la concentración correspondiente durante 18h en condiciones de oscuridad, durante este tiempo los peces se mantuvieron en peceras de plástico con 2L de agua. Cumplido el periodo de tratamiento los peces regresaron a las peceras de 40L hasta regenerar la aleta completa.

Para dichos tratamientos se utilizaron 10 peces con el agonista de RAR β (AC55649), de los cuales 4 son controles (únicamente tratados con el vehículo, DMSO) y 6 fueron tratados con el fármaco. Mientras que para el antagonista de RAR β (LE135) se utilizaron un total de 19 peces, de los cuales 4 fueron tratados con DMSO y 15 con el fármaco. Es importante mencionar que con esos 15 peces se realizaron tres ensayos diferentes, siendo que en el primero se utilizaron 6, de los cuales murieron 4, para el segundo se utilizaron 3 y murieron 2, y para el tercero se utilizaron 6 de los cuales ninguno murió. Así que al final sobrevivieron 4 peces tratados con DMSO y 9 con el fármaco.

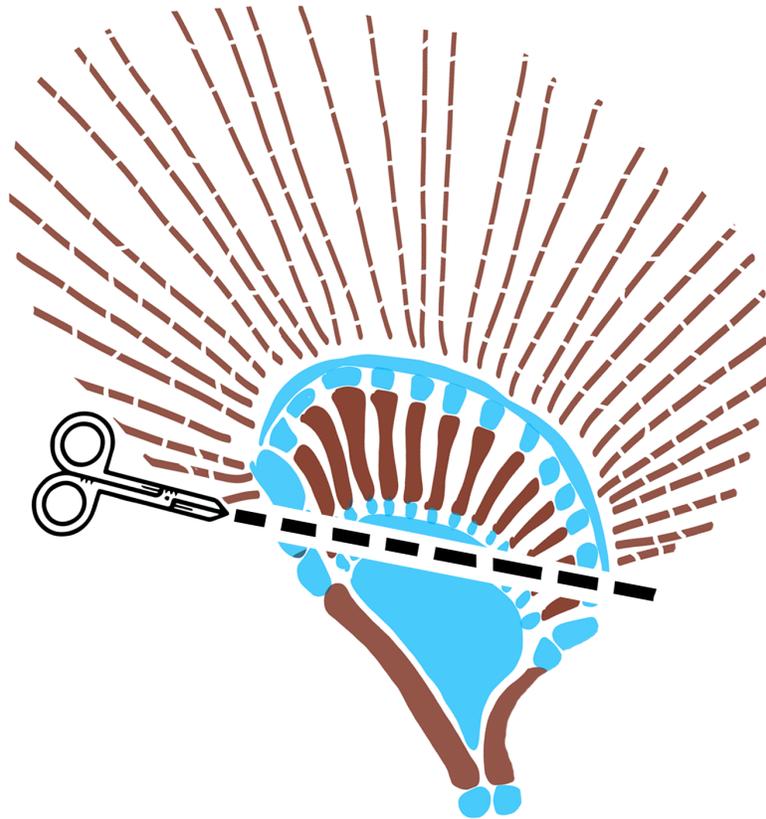


Figura 3. Plano de amputación. La línea discontinua indica el nivel al cual se realiza la amputación, sobre la base de los radiales.

Tinción de esqueleto

Para observar el efecto de activación e inactivación del RAR β en las aletas regeneradas se realizó la tinción de esqueleto, para ello la aleta amputada se fijó y deshidrató en etanol al 100% por 24h, posteriormente se permeó en acetona por 24-48 con ligera agitación, se mantuvieron en una solución de azul Alciano (3%) y Alizarina roja (3%) en etanol (70%) y ácido acético (5%) por 48h con agitación ligera, transcurrido este tiempo se aclaró en Glicerol (20%) y KOH (1%), realizando recambios de la solución hasta observar el esqueleto. Para mejores resultados primero se aclaraba 12h en una solución de glicerol (20%) y KOH (3%), y posteriormente se realizan los recambios con la solución que contiene menor porcentaje de KOH, hasta ver el esqueleto. Las muestras se almacenaron en glicerol-etanol. Se tomaron fotografías de las muestras con una cámara AxioCam MRc Zeiss, conectada a un microscopio estereoscópico.

Extracción de RNA y PCR

Se obtuvieron muestras de RNA de 6 etapas durante la regeneración de las aletas pectorales de los peces (24 horas post amputación (hpa), 3 (días post amputación) dpa, 7dpa, 9dpa, 17dpa y aleta completa), para ello se realizó el corte ya mencionado y se dejaron los peces en recuperación hasta el tiempo establecido de cada etapa, concluido el respectivo periodo se recolectó el tejido regenerado y se realizó la extracción de RNA con Trizol (Invitrogen) que posteriormente se cuantificó en un Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Para realizar el análisis de los genes de interés se sintetizó cDNA mediante RT-PCR con la enzima Superscript III (Invitrogen) a partir del RNA extraído de cada muestra. El experimento se realizó por triplicado en dos grupos diferentes de peces, es decir que al final se obtuvo n=6 para cada etapa.

A continuación, se muestra una tabla con los primers para cada gen.

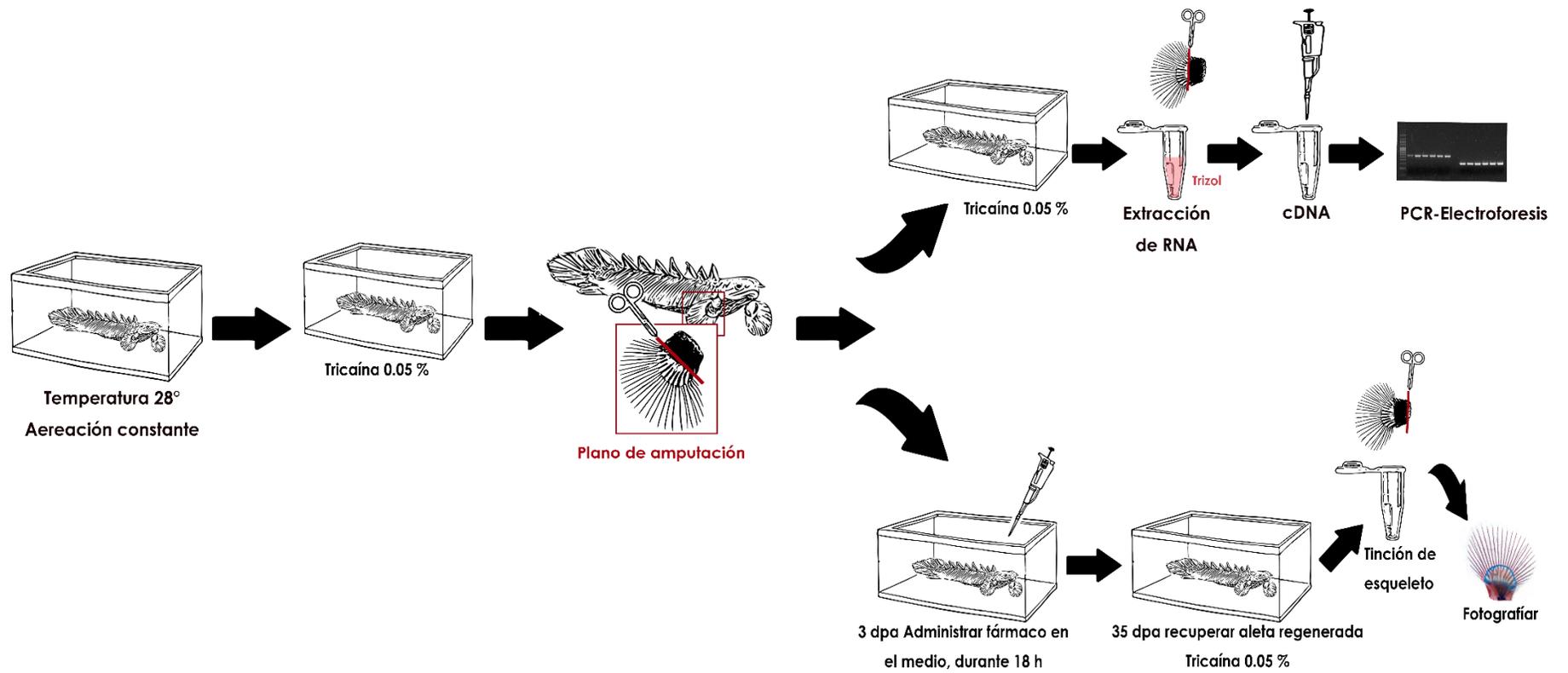
Tabla 1. Tabla con características de los primers utilizados para <i>Polypterus senegalus</i>			
Gen	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Tamaño amplicón (pb)
<i>Gapdh</i>	Fw: AGAGGAGCAAGGCAATTTGGT	HK*	331
	Rv: CATGGACGCTTCAAGGGTGA	60-70	
<i>Raldh2</i>	Fw: CTTCATCGAGCCGACTGTTT	64	513
	Rv: TGTGGCACAGGTAGAGATGG		
<i>Cyp26a1</i>	Fw1: GTTCAGGCACTCTTCCAGTT	60	245
	Rv1: TCGTTTGTAGTCTTCTCGGGTTC		
<i>Hoxa11</i>	Fw: TGTTTTCTTCTCGCCGCTCTTT	PCR-TD*	451
	Rv: CGTCATAGGGCGAGAAGACGG		
<i>Hoxa13</i>	Fw: GATCGCCCAAGGCTGGTAACTTT	64.3	425
	Rv: AGGCAACTTTGCTGCGAACC		
<i>Hoxd9</i>	Fw: GGCACGAGACGGAGGATGTCTAT	62.3	472
	Rv: GGACTCACTGTTGCTGGAAATG		
<p>➤ HK* Gen housekeeping utilizado como control de expresión y carga, es decir, que se realizó a la par de cada gen de interés.</p> <p>➤ PCR-TD* El programa de PCR Touch Down fue: 1ra Fase – Tm: 70°C, -3°C cada ciclo, 28 ciclos 2da Fase – Tm: 61° C, 15 ciclos</p>			

Tabla 2. Tabla con secuencias de <i>Polypterus senegalus</i> para diseño de primers	
Gen	No. de acceso GenBank
<i>Gapdh</i>	AB539138.1
<i>Raldh2</i>	HQ876171.1
<i>Cyp26a1</i>	No reportada en <i>Polypterus senegalus</i> *
<i>Hoxa11</i>	AC126321.1
<i>Hoxa13</i>	AC126321.1
<i>Hoxa9</i>	HQ168527.1
*En este caso se utilizó una secuencia que se obtuvo en laboratorio con ayuda de primers degenerados. (Datos no publicados)	

Para poder visualizar los resultados de PCR se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1%, una vez obtenido el gel correspondiente de cada gen, estos fueron fotografiados y posteriormente las fotografías se analizaron con el programa Kodak® 1D Image Analysis Software, el cual permite cuantificar por medio de la intensidad de pixel en la fotografía, de esta manera se puede obtener un resultado más allá de lo cualitativo, aunque cabe resaltar que para obtener resultados meramente cuantitativos, estos experimentos deben realizarse con una qPCR. Los datos de la cuantificación en las fotografías fueron promediados y finalmente se calculó la intensidad de expresión de cada gen respecto a *Gapdh*. Estos últimos datos fueron graficados.

Al final todas las figuras se realizaron en el programa Adobe Photoshop CC 2017.

Figura 4. Diagrama metodológico



RESULTADOS

Etapas de regeneración

Para analizar la expresión temporal de los diferentes genes se dividió el proceso de regeneración de la aleta en seis etapas, como se puede observar en la **Figura 5** el cierre de la herida sucede 24 hpa, a los 3 dpa comienza la formación del blastema sobre el borde de la herida, a los largo del eje ateroposterior, a los 7 dpa esta estructura denominada blastema se encuentra en crecimiento, a los 9 dpa comienza la diferenciación de cartílago mientras que a los 17 dpa comienzan a formarse los radios y como puede observarse la zona que corresponderá a los radios y a los radiales se puede diferenciar a simple vista y finalmente 35 dpa la nueva aleta cuenta con todos sus elementos.

Expresión de *Raldh2* y *Cyp26a1* durante la regeneración de la aleta

Raldh2 y *Cyp26a1*, genes que codifican para las enzimas que sintetizan y catabolizan respectivamente el ácido retinoico, se ha visto que participan en la regeneración de extremidades en otras especies, trabajos muestran alteraciones en extremidades regeneradas cuando se realizan tratamientos con AR exógeno. (Monaghan & Maden, 2012) En *Polypterus senegalus* se ha demostrado la participación de esta vía de ácido retinoico, (Cuervo et al., 2012a) sin embargo, al ser un modelo relativamente nuevo no se ha establecido una expresión temporal de los genes que participan en el proceso de regeneración de la extremidad de *Polypterus senegalus*. En la **Figura 6** se puede observar que *Raldh2* se expresa en todas las etapas de regeneración, sin embargo, los niveles de expresión varían a lo largo del proceso. En la Ac los niveles de expresión se encuentran cerca de 0.8 con respecto a *Gapdh*, ahora bien, tomando como referencia este valor se puede apreciar que estos niveles son menores en un 15% durante el cierre de la herida (24 hpa) y posteriormente es un 15% mayor en a los 3 dpa, cuando está en formación el blastema, para los 7 dpa los niveles de expresión son muy semejantes al observado durante del cierre de la herida, así como en etapas posteriores los niveles se vuelven cada vez más similares a los observados en la aleta completa. En cuanto a los niveles de expresión de *Cyp26a1* se puede ver que en la Ac estos se encuentra en 0.5 respecto a *Gapdh* tomando como referencia este valor, se nota que durante el cierre de la herida son aproximadamente un 13% menores, a partir de esto se puede apreciar que en etapas posteriores los niveles de expresión poco a poco son mayores, sin embargo, todos estos niveles se mantienen entre 0.43 y 0.53 respecto a *Gapdh*.

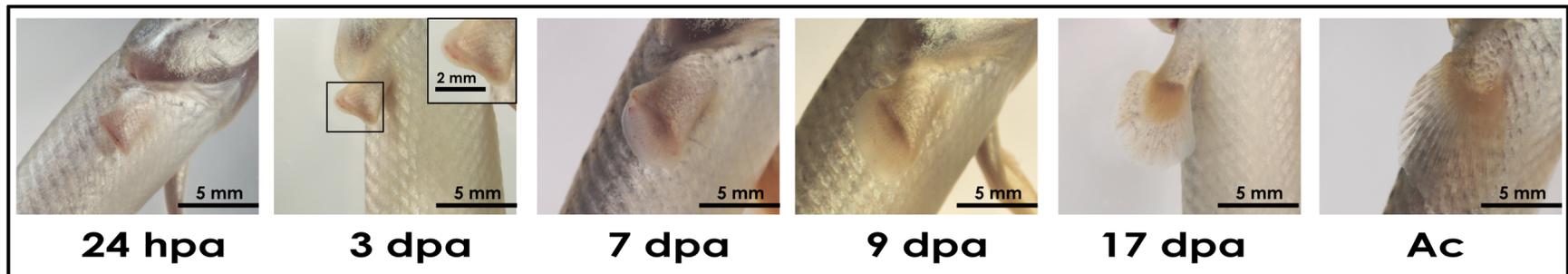


Figura 5. Etapas de regeneración de la aleta pectoral de *Polypterus senegalus*. Vista lateral externa de la aleta derecha en regeneración de diferentes peces desde las 24 horas post amputación hasta la formación de la aleta completa. 24 hpa cierre de la herida, 3 dpa formación del blastema, 7 dpa crecimiento del blastema, 9 dpa formación de cartílago, 17 dpa formación de radios y 35 dpa se muestra una Ac.

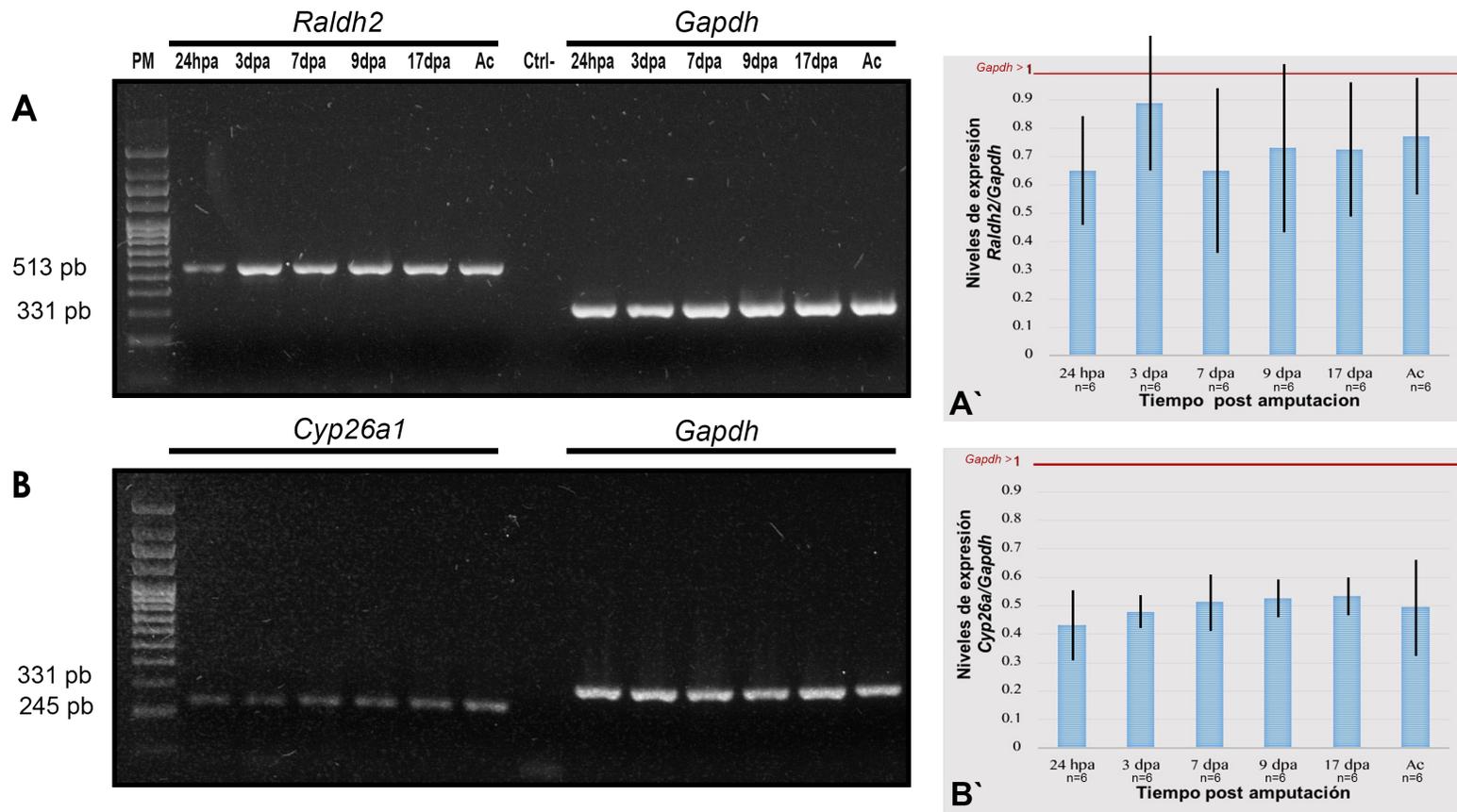


Figura 6. *Raldh2* y *Cyp26a1* durante la regeneración de la aleta pectoral de *Polypterus*. Electroforesis del PCR punto final en geles de agarosa al 1%. En la parte superior del gel se indica la muestra que se evalúa (seis muestras). **A)** Amplificación de un fragmento de 513 pb correspondiente a *Raldh2* expresando en todas las muestras de cDNA. **B)** Amplificación de un fragmento de 245 pb correspondiente a *Cyp26a1* expresado de igual forma en todas las muestras. **A')** Gráfico representativos de los niveles de expresión promedio de *Raldh2* durante la regeneración de la aleta. **B')** Gráfico representativo de los niveles de expresión promedio de *Cyp26a1* durante la regeneración de la aleta. En el eje X se muestran las etapas de la regeneración mientras en el eje Y se muestran los niveles de expresión respecto a *Gapdh*=1. Ctrl -: control negativo del gen de interés, hpa: horas post amputación, dpa: días post amputación, PM: peso molecular, pb: pares de bases, las líneas negras indican la desviación estándar.

Expresión de genes *Hox* durante la regeneración de la aleta

También se evaluaron los niveles de expresión de genes *Hox* involucrados en desarrollo de la extremidad y regeneración, como se puede observar en la **Figura 7**. *Hoxa11*, muestra niveles de expresión similares a los del gen control. El nivel de expresión en la Ac es de 0.97 respecto a *Gapdh*, es decir que son muy similares, tomando este valor como referencia, durante el cierre de la herida hay un menor nivel de expresión, cabe mencionar que es el nivel más bajo, sin embargo, dicho nivel no baja de 0.9 respecto a *Gapdh*, en las etapas siguientes los niveles de expresión comienzan a subir hasta 1.01 a los 9dp y para la siguiente etapa, 17 dpa, se observa un nivel menor.

La expresión temporal de *Hoxa13* se muestra bastante interesante ya que se puede observar claramente, tanto en el gel representativo como en la gráfica, que los niveles de expresión van en aumento conforme transcurre la regeneración. En Ac se observa un nivel de expresión de 0.87 respecto a *Gapdh*, tomando como referencia este valor se observa una disminución de casi el 50% en dicho nivel durante el cierre de la herida, como ya se mencionó en etapas posteriores los niveles de expresión van aumentando gradualmente hasta llegar al nivel de Ac.

Por otro lado, también se determinaron los niveles de expresión de *Hoxd9*, en este caso los niveles de expresión fueron muy similares entre sí y en comparación a de *Gapdh*, en Ac se puede observar un nivel de expresión de 1, respecto al control, ahora bien, tomando como referencia este valor se observa una disminución del 15% durante el cierre de la herida, mientras que en el resto de las etapas se muestra un nivel de expresión superior a *Gapdh*, siendo que a los 9 dpa se muestra el nivel de expresión más alto, aunque sólo hubo una diferencia del 5% respecto a la Ac.

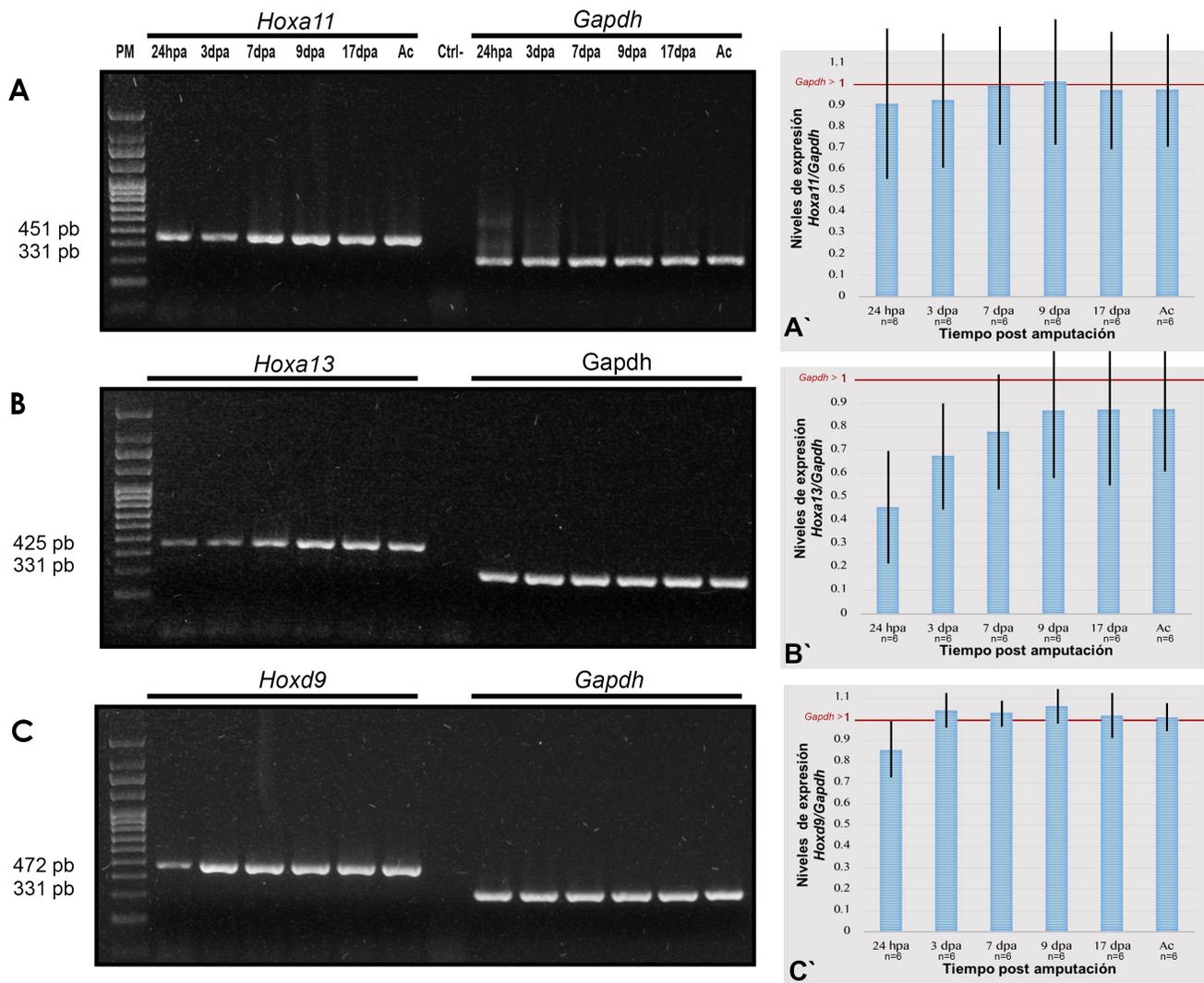


Figura 7. Genes Hox durante la regeneración de la aleta pectoral de *Polyoterus*. **A)** Amplificación de un fragmento de 451 pb correspondiente a *Hoxa11*. **B)** Amplificación de un fragmento de 425 pb correspondiente a *Hoxa13*. **C)** Amplificación de un fragmento de 472 pb correspondiente a *Hoxd9*. **A')** Gráfico representativos de los niveles de expresión de *Hoxa11* durante la regeneración de la aleta. **B')** Gráficos representativos de la expresión de *Hoxa13* durante la regeneración de la aleta. **C')** Gráficos representativos de la expresión de *Hoxd9* durante la regeneración de la aleta. En el eje X se muestran las etapas de la regeneración mientras en el eje Y se muestra la intensidad de expresión respecto a *Gapdh*=1.

Activación e inactivación del RAR β produce alteraciones en aletas regeneradas

Como se puede observar en la **Figura 8**, en el experimento donde se activó el RAR β se obtuvieron dos fenotipos en proporciones iguales, denominados Fenotipo 1 y Fenotipo 2, que se describirán a continuación, por su parte en las aletas control, tratadas solamente con el vehículo del fármaco, se obtuvo que la aleta cuenta con un promedio de 10.6 radiales, 29 radios y 262.3 articulaciones.

El Fenotipo 1 se caracteriza por una regeneración hipomórfica, es decir, que el tamaño de la aleta es pequeño, sin embargo, interesantemente hay un 30% de radiales extra, lo cual puede tomarse como una polidactilia, ya que, se trata de una estructura homóloga al autópedo de la extremidad de tetrápodos; (Cuervo et al., 2012a) por otro lado, en la lepidotriquia la cantidad de radios es ligeramente menor, alrededor de un 5% menos, mientras que en el número de articulaciones hay un decremento del 50% de las articulaciones. Otra característica interesante de este fenotipo es la diferencia en la maduración de hueso y cartílago, ya que, como se puede ver en los radiales son en su mayoría cartílago salvo un par de pequeños parches revelan presencia de hueso, a diferencia del control donde los radiales son mayormente tejido óseo. El Fenotipo 2 a simple vista parece muy semejante a la aleta control, ya que son de tamaño similar, sin embargo, de igual manera que en el fenotipo anterior se encontró que hay más de un 30% de radiales extra, en cuanto a la lepidotriquia se puede observar que hay aproximadamente 12% más radios, al igual que de articulaciones. Para este fenotipo los radiales esta compuestos de cartílago y hueso, como se observan normalmente, con la diferencia que la zona de tejido óseo es más corta.

Cabe destacar que en todas las aletas de este experimento se encontraron radiales y radios, con bifurcaciones, es decir, en forma “Y”, las cuales se consideran fenotipos normales, (Nikiforova & Golichenkov, 2012a).

Control

Agonista RAR β (AC55649)

Fenotipo 1

Fenotipo 2

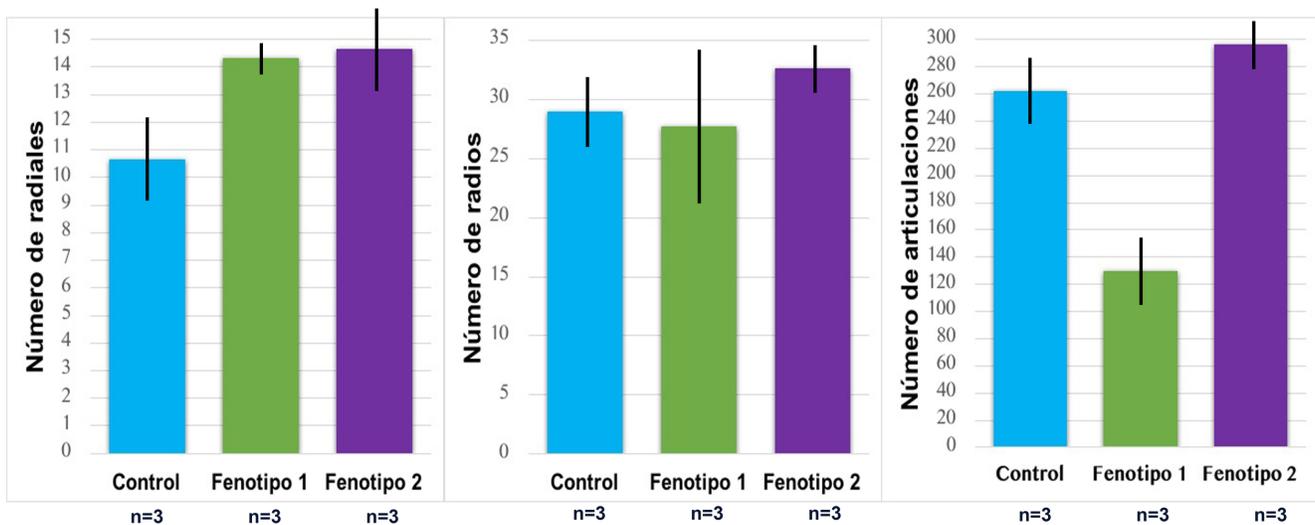
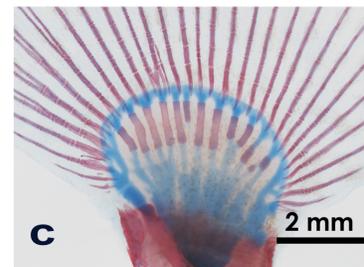
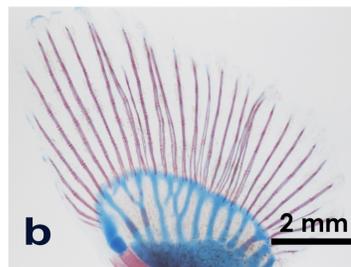
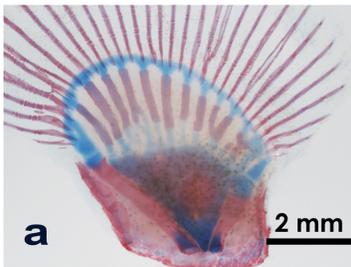
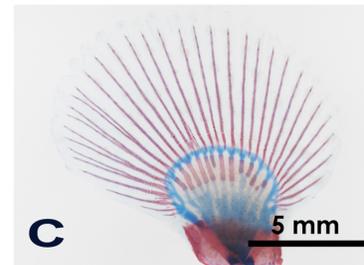
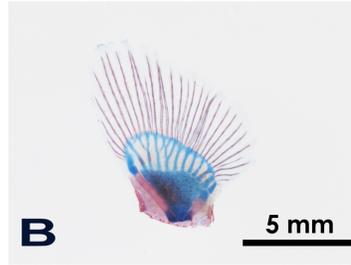
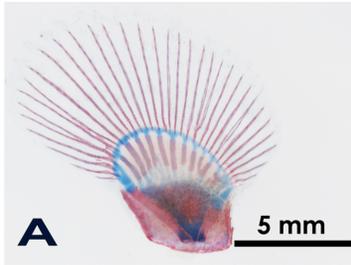


Figura 8. El agonista de RAR β produce hipomorfismo, polidactilia y alteraciones en la diferenciación del cartílago durante la regeneración de la aleta. Tinción de esqueleto de aletas pectorales izquierdas regeneradas tratadas con el agonista de RAR β (AC55649) 100 nM, en el 3^{da} día por 18 hrs **A)** Aleta control tratada con el vehículo del fármaco (DMSO). **B)** y **C)** Corresponden a aletas con fenotipos generados por el agonista de RAR β . **a), b)** y **c)** Corresponden a aumentos de las fotografías ya mencionadas. En las gráficas se muestran el número de radiales, radios y articulaciones correspondientes de cada fenotipo obtenido. En el eje X se muestra la cantidad de elementos mientras que en el eje Y se muestran cada fenotipo. Tinción de esqueleto: azul=cartílago y rojo=hueso.

En el caso de la inactivación del RAR β se obtuvo que los controles tuvieron un promedio de 11.25 radiales, 32.7 radios y 257.5 articulaciones (**Figura 9**). Los resultados obtenidos con este tratamiento fueron más variables a diferencia del agonista, ya que aquí se obtuvieron cuatro fenotipos.

El Fenotipo 1 es de gran interés ya que como se puede apreciar en la imagen B y b de la **Figura 8**, no hay presencia de cartílago o tejido óseo en la zona en que deberían aparecer los radiales. Cabe señalar que la lepidotriquia es más pequeña, los radios son más cortos y en las gráficas se puede ver con mayor claridad que hay cerca de un 30% menos radios, mientras que hay casi un 60% menos articulaciones. El Fenotipo 2 se caracteriza por tener radiales con tejido cartilaginoso, sin embargo, en este caso los radiales no son continuos, es decir, la tinción revela parches de diferente intensidad, aunque es posible contar los radiales presentes, de los cuales hay una menor cantidad, pero esto no rebasa el 10%, en cuanto a los radios se observa un 20% menos radios y un 40% menos articulaciones. En el Fenotipo 3 se muestra una aleta más pequeña, es decir como en el caso del tratamiento con el agonista, se presenta una regeneración hipomórfica, además de ello también se encontró un 15% más radiales que en el control, casi un 30% menos articulaciones y un 60% menos articulaciones, al igual que en otros casos mencionados los radiales solo son de cartílago. El Fenotipo 4, a pesar de ser semejante al control, también muestra características interesantes, y es que en este caso la cantidad de estructuras es superior al de los controles, ya que se obtuvo casi un 25% más radiales, los radios son casi la misma cantidad, aunque rebasa el promedio de los controles, y hay más de 30% de articulaciones extra. Sin embargo, es importante señalar que este es el único fenotipo en el que los radiales están conformados de tejido óseo y cartilaginoso, como se muestra en los controles, aunque se puede ver más tejido óseo.

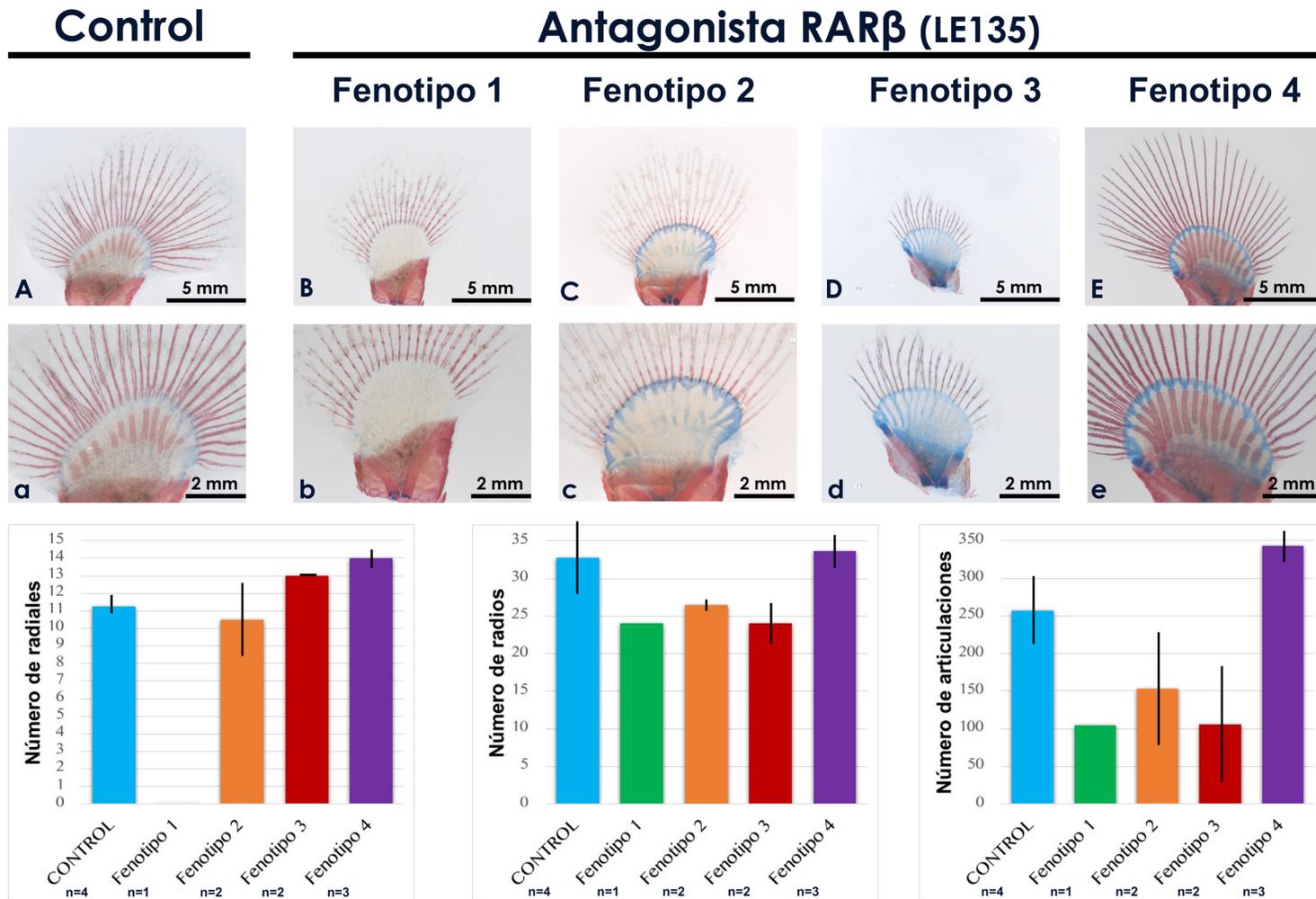


Figura 9. El antagonista de RAR β produce hipomorfismo, polidactilia e inhibición y alteraciones en diferenciación del cartílago durante la regeneración de la aleta. Tinción de esqueleto de aletas pectorales derechas regeneradas tratadas con el antagonista de RAR β (LE135) 50 nM, en el 3dpa por 18 hrs. **A)** Aleta control tratada con el vehículo del fármaco (DMSO). **B), C), D)** y **E)** Corresponden a aletas con fenotipos generados por el tratamiento con el antagonista de RAR β . **a), b), c), d)** y **e)** Corresponden a aumentos de las fotografías antes mencionadas.

DISCUSIÓN

La regeneración no solo implica la restauración de estructuras perdidas, sino también la correcta integración de la información posicional y correcto modelamiento espacial. *Polypterus senegalus* es un pez que posee una sorprendente habilidad para regenerar sus aletas pectorales, la cual solo es comparable a la observada en anfibios urodelos, como el ajolote. Es bien sabido que el pez cebra representa un buen modelo para el estudio de la regeneración ya que puede regenerar diversos órganos como corazón, retina, espina cordal, así como sus aletas, sin embargo, las aletas de *Polypterus* poseen una mayor complejidad debido a que poseen endoesqueleto sofisticado y prominente musculatura proximal, (Takeuchi, Okabe, & Aizawa, 2009b). Cabe destacar que esa complejidad ha permitido establecer una homología entre las aletas de *Polypterus* y las extremidades de los tetrápodos (**Figura 1**).

Ahora bien, se sabe que la regeneración en *Polypterus* es llevada a cabo mediante epimorfosis, como podemos observar en los resultados, se logró un seguimiento de dicho proceso (**Figura 5**). Posterior a la amputación, la epidermis de la herida recubre el plano de amputación (cierre de la herida) y debajo de esta se forma un blastema que conforme el transcurso de la regeneración aumenta de tamaño y se extiende a lo largo del plano de amputación, es decir, sobre el eje anteroposterior. (**Figura 5, Zoom 3 dpa**). Dicho crecimiento de la aleta regenerante es acompañado por la formación de *novo* de las estructuras de la aleta y cerca de la tercera semana se aparece un borde distinto, que distingue la futura zona de radiales y radios, (Nikiforova & Golichenkov, 2012b).

Bajo dichos conocimientos se realizó el esquema para la extracción de RNA, el cual permite establecer los niveles de expresión de los genes de interés en seis etapas a lo largo de la regeneración. Es importante mencionar que estos niveles de expresión no muestran la actividad de la proteína que codifican, sin embargo, se obtiene un preámbulo de su posible actividad, lo cual se confirmara con otras pruebas no realizadas en este trabajo.

Se ha visto que el ácido retinoico juega un papel importante durante el desarrollo y regeneración de extremidades de diversos modelos animales. Como se puede observar en los resultados los niveles de expresión de *Raldh2* son detectables mediante PCR y varían a lo largo de la regeneración. Dentro de las funciones del ácido retinoico en etapas adultas, se encuentra la homeostasis epitelial y el funcionamiento del sistema inmune, esto puede explicar la presencia de *Raldh2* en la aleta completa, (Cunningham & Duester, 2015).

Estudios en pez cebra han determinado que *Raldh2* es esencial para el comienzo de la regeneración, durante el cierre de la herida y formación del blastema se observó una expresión continua, además en etapas más tardías se sabe de su participación para el

establecimiento de ejes, esto sugiere una actividad de la vía de señalización de ácido retinoico en dos fases de la regeneración. Esto se puede ver en aletas de larva de pez cebra, así como en corazón y aletas de pez adulto, es decir, que se observa lo mismo en la regeneración de tejidos morfológicamente diferentes, lo cual habla de una vía sumamente conservada, (Mathew et al., 2009).

Para el caso de *Polypterus senegalus* se halló una correlación con lo expuesto anteriormente, desde el cierre de la herida (24 hpa) se observó la expresión de *Raldh2* e interesantemente durante la formación del blastema (3 dpa) se observa un aumento en la expresión de *Raldh2*, conforme avanza la regeneración los niveles son menores, sin embargo, son superiores a los observados durante el cierre de la herida, lo cual también podría indicar su participación en el establecimiento de ejes en este modelo, así como reafirmar la conservación de la vía de ácido retinoico en el proceso de regeneración incluso en es este modelo ancestral.

Por otro lado, los niveles de expresión de *Cyp26a* no varían como los de *Raldh2* y en todo momento son menores a estos, aunque interesantemente en algunas etapas en donde los niveles de expresión son más altos, como ocurre de 7dpa a 17dpa, los niveles de expresión en *Raldh2* son bajos, sin embargo, esto no aplica en todas las etapas. Algo que hay que tener muy en cuenta es que existen dos metabolitos que genera *Cyp26a*, siendo que uno de ellos aún puede ser activo (4-oxo-AR).

Existen reportes en *Xenopus* en los que se ha encontrado que *Cyp26a* protege al blastema de efectos del AR, es decir, que evita la re-especificación del blastema y cambios de información posicional, (Cuervo & Chimal-Monroy, 2013). De igual manera se ha encontrado que durante la regeneración del lente ocular en *Xenopus* la participación de *Cyp26a*, aunque no del todo claro, es importante para que se lleve a cabo la regeneración, se ha visto que al antagonizar esta molécula hay una reducción significativa en la proliferación celular, (Thomas & Henry, 2014). En los resultados encontrados en esta investigación podemos apreciar en la **Figura 6, B'** que hay una tendencia en aumento en los niveles de expresión de *Cyp26a* posterior al cierre de la herida y al llegar a la aleta completa estos niveles son menores, además al observar los gráficos representativos de los niveles de expresión de ambos genes se puede apreciar que en algunas etapas el comportamiento de un gen encaja con el otro, es decir, de 3dpa hacia 7dpa en *Raldh2* va de una nivel de expresión mayor a uno menor, mientras que en el caso de *cyp26a* es al contrario, mientras que a los 3dpa hay un nivel menor de expresión a los 7dpa observamos un valor más grande, sucede algo similar durante la etapa final de formación de la aleta, de la etapa 17dpa hacia Ac, por lo que se podría sugerir que en *Polypterus senegalus*, en estas etapas mencionadas, *Cyp26a* actúa contrarrestando los efectos por la

expresión de *Raldh2*, precisamente durante la formación y crecimiento del blastema, así como en las etapas finales de formación de los radios y maduración de la aleta completa.

Por otro lado, se obtuvo la expresión temporal de genes Hox, este conjunto de genes se encuentra altamente conservado en el reino animal, tan es así que el patrón de expresión que se observa durante el desarrollo de extremidades en ajolote, es comparable al observado en pollo y ratón, (*Durstón, 2012*), (*Gardiner, Blumberg, Komine, & Bryant, 1995*). Se sabe que en vertebrados hay de 4 a 8 clusters de genes Hox, en el caso de *Polypterus senegalus* se han establecido cuatro: Hoxa, Hoxb, Hoxc y Hoxd. Dichos genes desenvuelven un papel importante regulando la regeneración de extremidades, se les ha visto asociados a la formación de ejes primarios, crecimiento y organización de estructuras tanto en desarrollo como en regeneración de extremidades. Se ha determinado que los clusters Hoxa y Hoxd son los más importantes durante el desarrollo de la extremidad, ya que la pérdida de función de ambos, solos o combinados, impactan fuertemente en la morfología de la extremidad, mientras que para Hoxb y Hoxc no hay fenotipos significativos, de forma particular los grupos paralogos del 9 al 13 están asociados en el modelamiento a lo largo del eje PD en la extremidad, (*Gardiner & Bryant, 2004*) (*Zakany & Duboule, 2007*) (*Pineault & Wellik, 2014*), es por ello que para la realización de este trabajo se decidió centrarse sobre los genes *Hoxa11*, *Hoxa13* y *Hoxd9*.

Los resultados muestran que los niveles de expresión de *Hoxa11* son muy similares a los de *Gapdh* y a lo largo del proceso de regeneración se mantienen valores semejantes entre sí. Se sabe que este gen se encuentra asociado estrechamente al correcto establecimiento del zeugópodo, sin embargo, el plano de amputación retira la parte de la aleta homóloga al autópedo. Es importante señalar que el gen en cuestión también estimula la condensación digital, que son estructuras que forman parte del autópedo, asimismo, de forma general se asocia a los genes Hox al tejido musculoesquelético (*Zakany & Duboule, 2007*).

Por su parte el patrón de expresión de *Hoxa13* es bastante claro, siendo que hay una tendencia en aumento de los niveles de expresión del gen posterior a la amputación. Este gen se encuentra estrechamente relacionado a la correcta especificación del autópedo, (*Pineault & Wellik, 2014*) lo cual puede sugerir que durante la regeneración de extremidades en *Polypterus senegalus* existe una especificación tardía de los elementos distales de la extremidad, es decir, el autópedo. Además, hay reportes en ajolote en los que se menciona que el AR regula negativamente *Hoxa13*, y como se ha visto en este trabajo los niveles de expresión de *Raldh2*, enzima que sintetiza el AR, se encuentra elevados al tercer día de amputación y posteriormente disminuye dicha expresión, mientras que la de *Hoxa13* va en aumento. Esta regulación negativa se puede apreciar más claramente durante la formación y crecimiento del blastema, recordando que *Raldh2*

a los 3dpa se encuentra en su máximo nivel de expresión y para los 7dpa estos niveles son menores, mientras que en para *Hoxa13* durante la formación del blastema los niveles son menores que cuando se encuentra en crecimiento (7dpa).

Por otro lado, la expresión de *Hoxd9* es similar a la que se observa en *Hoxa11*, con la diferencia de que los niveles de expresión de *Hoxd9* son un poco mayores. *Hoxd9* es un gen estrechamente relacionado con la especificación del estilópodo y zeugópodo junto con *Hoxd10*. No obstante la experimentación en *Polyterus* se llevó a cabo a partir del homólogo de autópedo, lo que podría sugerir que existe parte del zeugópodo o estilópodo en esta parte distal de la aleta, recordando que dicha especie vivió en la época de transición de la vida del agua a la tierra, es decir, transición en la evolución de las extremidades, o bien esta expresión puede estar asociado a algún tejido de la extremidad en regeneración.

Estudios han demostrado que una vez formado el blastema, los genes Hox se expresan y se regulan de la misma manera que cuando el miembro se desarrolló por primera vez, durante el este desarrollo los genes Hox se encuentran activos en más de un estadio asociados al reclutamiento de células en la condensación de cartílago, así como en el crecimiento del mismo y en osificación endocondral. Después de la amputación de la parte distal de la extremidad, la regeneración se produce a partir de una base de células diferenciadas derivadas de todos los puntos de la circunferencia de la extremidad, estas células se movilizan y vuelven a entrar en un estado similar al desarrollo embrionario sin embargo llevan una memoria sobre su posición anterior, por lo que, durante la regeneración la activación de las células para su reingreso a un estado similar al de desarrollo implica el establecimiento del patrón proximodistal, (Rijli & Chambon, 1997), (Gardiner & Bryant, 2004).

Es bien sabido que el ácido retinoico juega un papel importante durante el desarrollo y regeneración de la extremidad actuando a través de los RARs, sin embargo, no se conoce cuál es la función específica de cada receptor. Trabajos no publicados en los que se evalúan diversos agonistas y antagonistas de los RARs en *Polyterus* arrojaron resultados que podrían ser interesantes en RAR β y sobre ello se realizó el presente trabajo. Se realizaron tratamientos con un agonista (AC55649) y antagonista (LE135) específicos del RAR β , sabiendo que dicho receptor ha mostrado ser importante durante la regeneración de extremidades. Para ello se administraron los fármacos al 3 dpa, como ya se mencionó, durante esta etapa ocurre la formación del blastema, lo que indica una mayor proliferación celular que favorece la acción de los fármacos en una mayor cantidad de células, además de que durante esta etapa el blastema es más sensible a retinoides, (Cuervo & Chimal-Monroy, 2013).

Con el agonista de RAR β se obtuvieron dos fenotipos en proporciones iguales, el primer caracterizado por presentar hipomorfismo, es decir el tamaño de aleta es menor, sin embargo, es interesante ver que hay un mayor número de radiales, lo cual al tratarse de una estructura homóloga al autópodo de tetrápodos podría tratarse de una polidactilia, del mismo modo se observa que en la lepidotriquia hay menor cantidad de radios y articulaciones. El segundo fenotipo es en apariencia similar al control ya que no hay diferencia de tamaños, no obstante, se encontraron radiales extra, en cuanto a la zona de lepidotriquia también se observa un aumento en el número de radios y articulaciones. Es interesante ver como en este fenotipo los radiales están compuestos de cartílago y hueso, como se observan en el control, pese a ello, con el tratamiento la zona de tejido óseo resultó ser más corta.

Algo que se observa en los todos los fenotipos obtenidos son bifurcaciones en forma de “Y” y “U” las cuales se han descrito como fenotipos normales. El número normal de radios y radiales reportados en la literatura es variable, ya que algunos autores refieren que hay un promedio de 16 radiales y 25 radios, (Nikiforova & Golichenkov, 2012) mientras que otros solo refieren un promedio de 13.6 radiales, (Cuervo et al., 2012a). En este trabajo se obtuvo un promedio general (considerando solo los controles de ambos experimentos) de 11 radiales, 31.1 radios y 259.5 articulaciones.

Observar una mayor cantidad de radiales es interesante ya que en la regeneración de aletas pectorales en *Polypterus* se ha observado una tendencia reductiva en la cantidad de los elementos esqueléticos, tras una amputación, es decir, que se trata de una polidactilia.

Se ha demostrado la expresión de RAR β post-amputación de extremidad en tritones, por otro lado, la sobreactivación de dicho receptor en *Xenopus* causa una proximalización por AR a tal grado que se obtienen denominadas duplicaciones bilaterales, (Cuervo & Chimal-Monroy, 2013). Sin embargo, en este caso los resultados fueron diferentes, ya que en ningún caso hubo duplicaciones siendo algo de particular interés el cambio en el patrón condrogénico ya que en el caso de las aletas hipomórficas se muestra en mayor parte conformada por cartílago, mientras que el segundo fenotipo solo hay un ligero aumento.

Se sabe que el proceso de condrogénesis en el primordio de la extremidad está fuertemente modulados por la acción de los RARs, (Jiang et al., 1995). En mamíferos el AR juega un papel importante en el desarrollo de extremidades y crecimiento de huesos en fetos y vida postnatal, experimentalmente se sabe que el AR causa inhibición dosis dependiente del crecimiento longitudinal de hueso. Además, la inactivación de RARs en etapas tempranas de desarrollo altera la formación de estructuras esqueléticas, lo cual sugiere que el AR endógeno actúa a través de los RARs, (De Luca et al., 2000).

Dicha información citada previamente podría explicar el porqué de las aletas tratadas con el agonista presentan ese hipomorfismo. Ahora bien, la polidactilia que se aprecia podría ser resultado de una regulación positiva de SHH (Sonic hedgehog) por parte del AR a través de RAR β , siendo que experimentos en *Polypterus* donde se inhibe y se sobreexpresa SHH se obtienen un menor y mayor número de radiales y lepidotriquia respectivamente, (Cuervo, Hernández-Martínez, Chimal-Monroy, Merchant-Larios, & Covarrubias, 2012b).

Por otro lado, al antagonizar el RAR β se obtienen diversos resultados, uno de los más sorprendentes es la reducción de cartílago en el autópodo, incluso en un caso es tan marcado que se podría hablar de una ausencia de cartílago, en este caso también se podría sugerir la participación de SHH, al estar bloqueada la vía de retinoico a través de RAR β no hay regulación positiva de este gen, por lo que se observa una ausencia de dedos, es decir, una ectrodactilia.

CONCLUSIÓN

La expresión del programa que establece el desarrollo de extremidades vuelve a expresarse durante la regeneración de la aleta pectoral de *Polypterus senegalus*. Se determinó la expresión temporal de algunos de estos genes y se puede observar que interesantemente, *Raldh2* muestra niveles de expresión altos durante la formación del blastema a diferencia de las demás etapas, mientras que para *Cyp26a* se observan niveles de expresión bajos en las primeras dos etapas de regeneración, esto correlaciona con lo que se ha visto en otros modelos. Por su parte la expresión de *Hoxa11* y *Hoxd9* muestran niveles de expresión muy marcados, probablemente debido a al restablecimiento de la información posicional, además de que los genes *Hox* se les ha visto involucrados en la formación de musculo esquelético, por su parte la expresión temporal de *Hoxa13* sugiere la formación de estructuras distales en etapas tardías de regeneración. Los tratamientos con el agonista y antagonista de RAR β producen alteraciones en el tamaño, número y composición de estructuras que sugieren que este receptor regula la morfogénesis de la aleta, así como la maduración de la condrogénesis, sin embargo, estos resultados tendrán que ser confirmados con otros experimentos en un futuro.

REFERENCIAS

- Blum, N., & Begemann, G. (2012). Retinoic acid signaling controls the formation, proliferation and survival of the blastema during adult zebrafish fin regeneration. *Development*, 139(1), 107–116. <https://doi.org/10.1242/dev.065391>
- Chimal-Monroy, J., Correa-Gallegos, D., & Galván-Hernández, C. I. (2011). *Regeneración*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/235226028_Regeneracion
- Christensen, R. N., & Tassava, R. A. (2000). Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Developmental Dynamics*, 217(2), 216–224. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200002\)217:2<216::AID-DVDY8>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200002)217:2<216::AID-DVDY8>3.0.CO;2-8)
- Clevers, H., Loh, K. M., & Nusse, R. (2014). An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, 346(6205), 1248012. <https://doi.org/10.1126/science.1248012>
- Cuervo, R., & Chimal-Monroy, J. (2013). Chemical activation of RAR β induces post-embryonically bilateral limb duplication during *Xenopus* limb regeneration. *Scientific Reports*, 3, 1886. <https://doi.org/10.1038/srep01886>
- Cuervo, R., Hernández-Martínez, R., Chimal-Monroy, J., Merchant-Larios, H., & Covarrubias, L. (2012a). Full regeneration of the tribasal *Polypterus* fin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3838–3843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006619109>
- Cunningham, T. J., & Duester, G. (2015). Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(2), 110–123. <https://doi.org/10.1038/nrm3932>
- De Luca, F., Uyeda, J. A., Mericq, V., Mancilla, E. E., Yanovski, J. A., Barnes, K. M., ... Baron, J. (2000). Retinoic acid is a potent regulator of growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*, 141(1), 346–353. <https://doi.org/10.1210/endo.141.1.7283>
- Dinsmore, C. E. (2007). *A History of Regeneration Research: Milestones in the Evolution of a Science*. Cambridge University Press.
- Durston, Antony. (2012). Hox Genes: Master Regulators of the Animal Bodyplan. 10.5772/37007.
- Gardiner, D. M., Blumberg, B., Komine, Y., & Bryant, S. V. (1995). Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development (Cambridge, England)*, 121(6), 1731–1741.
- Gardiner, D. M., & Bryant, S. V. (2004). Molecular mechanisms in the control of limb regeneration: the role of homeobox genes. *International Journal of Developmental Biology*, 40(4), 797–805. <https://doi.org/10.1387/ijdb.8877453>
- Gilbert, S. F. (2000). Regeneration. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9971/>

- Jaenisch, R., & Young, R. (2008). Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*, *132*(4), 567–582. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.015>
- Jiang, H., Soprano, D. R., Li, S. W., Soprano, K. J., Penner, J. D., Gyda, M., & Kochhar, D. M. (1995). Modulation of limb bud chondrogenesis by retinoic acid and retinoic acid receptors. *The International Journal of Developmental Biology*, *39*(4), 617–627.
- Kam, R. K. T., Deng, Y., Chen, Y., & Zhao, H. (2012). Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. *Cell & Bioscience*, *2*, 11. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-11>
- Kerszberg, M., & Wolpert, L. (2007). Specifying Positional Information in the Embryo: Looking Beyond Morphogens. *Cell*, *130*(2), 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.038>
- Ledda-Columbano, G. M., Coni, P., Simbula, G., Zedda, I., & Columbano, A. (1993). Compensatory regeneration, mitogen-induced liver growth, and multistage chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, *101*(Suppl 5), 163–168.
- Liao, X., & Collins, M. D. (2008). All-trans retinoic acid-induced ectopic limb and caudal structures: Murine strain sensitivities and pathogenesis. *Developmental Dynamics*, *237*(6), 1553–1564. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21568>
- Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(11), 843–853. <https://doi.org/10.1038/nrn963>
- Maden, M., & Hind, M. (2003). Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule. *Developmental Dynamics*, *226*(2), 237–244. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10222>
- Mathew, L. K., Sengupta, S., Franzosa, J. A., Perry, J., La Du, J., Andreasen, E. A., & Tanguay, R. L. (2009). Comparative Expression Profiling Reveals an Essential Role for Raldh2 in Epimorphic Regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(48), 33642–33653. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011668>
- Michalopoulos, G. K. (2007). Liver Regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, *213*(2), 286–300. <https://doi.org/10.1002/jcp.21172>
- Monaghan, J. R., & Maden, M. (2012). Visualization of retinoic acid signaling in transgenic axolotls during limb development and regeneration. *Developmental Biology*, *368*(1), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.015>
- Nikiforova, A. I., & Golichenkov, V. A. (2012a). [Characteristics of the reparative regeneration of fins in the polypterid fish (Polypteridae, Actinopterygii)]. *Ontogenez*, *43*(2), 136–142.
- Pfefferli, C., & Jazwińska, A. (2015). The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration*, *2*(2), 72–83. <https://doi.org/10.1002/reg2.33>
- Pineault, K. M., & Wellik, D. M. (2014). Hox Genes and Limb Musculoskeletal Development. *Current Osteoporosis Reports*, *12*(4), 420–427. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0241-0>
- Rhinn, M., & Dollé, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development*, *139*(5), 843–858. <https://doi.org/10.1242/dev.065938>

- Rijli, F. M., & Chambon, P. (1997). Genetic interactions of Hox genes in limb development: learning from compound mutants. *Current Opinion in Genetics & Development*, 7(4), 481–487.
- Satoh, A., Makanae, A., & Wada, N. (2010). The apical ectodermal ridge (AER) can be re-induced by wounding, wnt-2b, and fgf-10 in the chicken limb bud. *Developmental Biology*, 342(2), 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.03.018>
- Seifert, A. W., & Muneoka, K. (2018). The blastema and epimorphic regeneration in mammals. *Developmental Biology*, 433(2), 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.08.007>
- Stocum, D. L., & Rao, N. (2011). Chapter 3 - Mechanisms of Blastema Formation in Regenerating Amphibian Limbs. In A. Atala, R. Lanza, J. A. Thomson, & R. Nerem (Eds.), *Principles of Regenerative Medicine (Second edition)* (pp. 67–86). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381422-7.10003-3>
- Suzuki, M., Yakushiji, N., Nakada, Y., Satoh, A., Ide, H., & Tamura, K. (2006). Limb regeneration in *Xenopus laevis* froglet. *TheScientificWorldJournal*, 6 Suppl 1, 26–37. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.325>
- Takeuchi, M., Okabe, M., & Aizawa, S. (2009a). The Genus *Polypterus* (Bichirs): A Fish Group Diverged at the Stem of Ray-Finned Fishes (Actinopterygii). *ResearchGate*, 2009(5), pdb.emo117. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo117>
- Takeuchi, M., Okabe, M., & Aizawa, S. (2009b). The genus *Polypterus* (bichirs): a fish group diverged at the stem of ray-finned fishes (Actinopterygii). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(5), pdb.emo117. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo117>
- Thomas, A. G., & Henry, J. J. (2014). Retinoic acid regulation by CYP26 in vertebrate lens regeneration. *Developmental Biology*, 386(2), 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.12.036>
- Wolpert, L. (2011). Positional information and patterning revisited. *Journal of Theoretical Biology*, 269(1), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.10.034>
- Young, R. A. (2011). Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell*, 144(6), 940–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.032>
- Zakany, J., & Duboule, D. (2007). The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(4), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.05.011>

ABREVIATURAS

Ac --- Aleta completa

AC55649 --- Agonista de RAR β

ADH --- Alcohol deshidrogenasa

AP --- Anteroposterior

AR --- Ácido retinoico

CEA --- Capa ectodérmica apical

CRBP --- Proteína celular de unión a retinol

CYP26A1 --- Citocromo P450 subfamilia 26

DMSO --- Dimetilsulfoxido

dpa --- Días post amputación

FGF --- Factor de crecimiento fibroblástico

Gapdh --- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HK --- Housekeeping

Hox --- Homeobox

hpa --- Horas post amputación

KOH --- Hidróxido de Sodio

LE135 --- Antagonista de RAR β

MMPs --- Metaloproteinasas de la matriz

Pb --- Pares de bases

PCR --- Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-TD --- PCR-Touch Down

PD --- Próximo-distal

PM --- Peso Molecular

qPCR --- PCR cuantitativa/tiempo real

RALDH --- Retinaldehído Deshidrogenasa
RARE --- Elemento de respuesta a ácido retinoico
RARs --- Receptores de Ácido Retinoico
RBP --- Proteína de unión a retinol
RDH --- Retinol deshidrogenasa
RXR --- Receptor de retinoides X
Wnt --- Proteínas tipo Wingle



UNAM
CUAUTITLÁN