



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Participación del ácido retinoico durante la regeneración de neuronas dopaminérgicas en el cerebro del ajolote (*Ambystoma mexicanum*)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LIBB. Roberto Damián García García

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jesús Chimal Monroy

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Diana María Escalante Alcalde

[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dra. Violeta Gisselle López Huerta

[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad de México. Mayo, 2023



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.

## ***FINANCIAMIENTO***

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) bajo la convocatoria Fronteras de la Ciencia con el Proyecto Número: 1887.

Durante la realización de este trabajo recibí una beca del CONAHCyT bajo la convocatoria de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado 2021, con número del Curriculum Vitae Único (CVU): 1101765.

Durante de este trabajo recibí un apoyo económico bajo la convocatoria del Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) 2022, para realizar una estancia corta de investigación en el laboratorio del Dr. Prayag Murawala en el Mount Desert Island Biological Laboratory (MDIBL) en Maine, Estados Unidos de América, durante el periodo de Octubre a Noviembre del 2022.

## ***AGRADECIMIENTOS***

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), la cual me brindó la oportunidad de desarrollarme tanto profesionalmente como personalmente dentro de sus aulas, auditorios y laboratorios desde mis estudios de bachillerato.

Al Dr. Jesús Chimal Monroy, por su guía y confianza depositada en estos últimos cinco años, donde tuve la oportunidad de encontrar en su laboratorio una de mis pasiones en la ciencia. Sus enseñanzas han dejado una huella duradera en mi formación como estudiante y futuro investigador.

A la Dra. Jessica Cristina Marín Llera, por su guía y apoyo desde que llegué a este laboratorio. Por sus constantes observaciones y críticas a este trabajo que ayudaron a mejorarlo.

A la Dra. Diana Escalante Alcalde, y a la Dra. Violeta Gisselle López Huerta, integrantes del Comité Tutor, cuyas observaciones y consejos ayudaron al desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, encargado de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por sus comentarios y ayuda para la adquisición y mejoramiento de las imágenes de esta tesis.

A la Dra. Margarita Gómez Chavarín, por su asesoría en la realización de las tinciones de Nissl en los cerebros de ajolote.

Al Dr. Omar Collazo Navarrete, y la Dra. Gilda Guerrero Flores, del Laboratorio Nacional de Recursos Genómicos (LaNReGen) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el acceso a los equipos para la realización de las qPCRs.

Al Dr. Prayag Murawala, por su asesoría en la implementación del HCR-FISH en el cerebro del ajolote, y por seguir colaborando con nosotros en este proyecto.

Al jurado conformado por los Dres.: Dr. Iván Velasco Velázquez, Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dra. Magdalena Guerra Crespo, Dr. Daniel Ríos Barrera, y Dr. Julián Valdés Rodríguez, cuyos comentarios ayudaron a obtener la mejor versión de este trabajo.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo, de la Biblioteca “Dr. Dionisio Nieto Gómez” del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su apoyo en la adquisición de material bibliográfico a lo largo de mis estudios en este Instituto.

# ÍNDICE

I.	LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
II.	LISTA DE FIGURAS Y TABLAS .....	8
III.	RESUMEN .....	10
IV.	ABSTRACT.....	12
V.	INTRODUCCIÓN .....	14
1.	REGENERACIÓN .....	14
2.	REGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (CNS).....	18
3.	EL AJOLOTE COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN DEL CNS .....	21
4.	DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SNC EN VERTEBRADOS Y DIFERENCIACIÓN AL LINAJE DOPAMINÉRGICO .....	28
5.	ÁCIDO RETINOICO Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DEL CNS .....	33
VI.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	36
VII.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	37
VIII.	HIPÓTESIS .....	37
IX.	OBJETIVO GENERAL .....	37
X.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
XI.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
1.	MANTENIMIENTO Y MANEJO DE AJOLOTES CRIADOS EN CAUTIVERIO .....	38
2.	INYECCIÓN INTRAVENTRICULAR EN EL CEREBRO DEL AJOLOTE .....	38
3.	EXTRACCIÓN DE CEREBRO COMPLETO Y CORTES POR CONGELACIÓN .....	39
4.	INMUNOHISTOQUÍMICA EN CEREBRO COMPLETO ( <i>WHOLE MOUNT</i> ) DEL AJOLOTE .....	40
5.	TINCIÓN DE NISSL.....	41
6.	INMUNOFUORESCENCIAS .....	42
7.	DISEÑO DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN EN CADENA <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (HCR-FISH) .....	42
8.	HCR-FISH ACOPLADA CON INMUNOFUORESCENCIA .....	43
9.	TUNEL ACOPLADO A INMUNOFUORESCENCIA.....	44
10.	EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA.....	45
11.	DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR TIEMPO REAL .....	45
12.	PCR EN TIEMPO REAL .....	46
13.	TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO.....	47
XII.	RESULTADOS.....	48
1.	LAS NEURONAS TH <sup>+</sup> SE ENCUENTRAN LOCALIZADAS EN LOS BULBOS OLFATORIOS, TELENCEFALO Y MESENFALO VENTRAL	48
2.	LAS NEURONAS TH <sup>+</sup> SE ENCUENTRAN LOCALIZADAS EN EL DIENCÉFALO VENTRAL, Y EN LA FRONTERA ENTRE EL DIENCÉFALO Y EL MESENFALO .....	49
3.	LAS NEURONAS TH <sup>+</sup> DEL MESENFALO VENTRAL COMPARTEN OTROS MARCADORES DOPAMINÉRGICOS COMO <i>NURR1</i> <sup>+</sup> Y <i>VMAT2</i> <sup>+</sup> .....	53
4.	LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE 6-OHDA PARA LA ELIMINACIÓN DE LAS NEURONAS TH <sup>+</sup> ES 6 µG/µL.....	55
5.	LAS NEURONAS TH <sup>+</sup> SON ELIMINADAS A LAS 24 HORAS POST INYECCIÓN DE 6-OHDA .....	55
6.	LA MUERTE NEURONAL ASOCIADA A LA INYECCIÓN CON 6-OHDA ES POR VÍA APOPTÓTICA .....	58
7.	LOS PROGENITORES NEURALES PROLIFERAN A LAS 24 HPI DE 6-OHDA.....	60
8.	LA REGENERACIÓN DE LAS NEURONAS TH <sup>+</sup> SE OBSERVA A LOS 10 DÍAS POST INYECCIÓN DE 6-OHDA.....	60
9.	LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS REGENERADAS A LOS 20 DPI SON NEUN <sup>+</sup> .....	61

10.	DURANTE LA REGENERACIÓN DE LAS NEURONAS TH <sup>+</sup> SE SOBREENPRESAN GENES ASOCIADOS A DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA .....	64
11.	INYECCIONES INTRAPERITONEALES DE ÁCIDO RETINOICO AUMENTA LA EXPRESIÓN DEL GEN RAR $\gamma$ EN EL CEREBRO DEL AJOLOTE. 67	
12.	EL AUMENTO EN LOS NIVELES DE ÁCIDO RETINOICO RETRASA EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN HACIA LINAJE DOPAMINÉRGICO .....	68
<b>XIII.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
<b>XIV.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>XV.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>81</b>
<b>XVI.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>82</b>
<b>XVII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>100</b>
	ANEXO I. SOLUCIONES USADAS .....	100
	ANEXO II. ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS USADOS .....	102
	ANEXO III. SONDAS PARA HCR-FISH .....	103
	ANEXO IV. INICIADORES Y HAIRPINS USADOS EN HCR-FISH.....	107
	ANEXO V. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA QRT-PCR .....	108
	ANEXO VI. PRUEBA DE OLIGONUCLEÓTIDOS EN cDNA CONTROL .....	111
	ANEXO VII. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS EN CEREBRO DE AJOLOTE.....	112
	ANEXO VIII. DETECCIÓN DE NEURONAS TH <sup>+</sup> EN BULBOS OLFATORIOS Y TELENCEFALO DEL AJOLOTE. ....	115

## ***I. LISTA DE ABREVIATURAS***

- 6-OHDA** – 6 Hidroxidopamina
- A-P** - Eje Antero-Posterior
- BMP** – Proteína Morfogenética del Hueso (siglas en inglés)
- CNS** – Sistema Nervioso Central (siglas en inglés)
- D-V** - Eje Dorso-Ventral
- DCX** – Doblecortina (siglas en inglés)
- ERG** – Célula Ependimoglia Radial (siglas en inglés)
- FGF** - Factor de Crecimiento de Fibroblastos (siglas en inglés)
- FOXA2** – Factor Nuclear de Hepatocitos 2 (siglas en inglés)
- FZ** – Zona Filamentosa (siglas en inglés)
- GBX2** – Gen específico de Gastrulación y Cerebro (siglas en inglés)
- GFAP** – Proteína Ácida Fibrilar Glial (siglas en inglés)
- HB** – Cerebro Posterior (siglas en inglés)
- HCR-FISH** - Hibridaciones en Reacción en Cadena in situ Fluorescentes (siglas en inglés)
- HRP** – Peroxidasa de Rábano (siglas en inglés)
- IF** – Inmunofluorescencia
- LMX1A/B** – Factor de Transcripción homeótico LIM 1 A y B (siglas en inglés)
- MB** – Cerebro Medio (siglas en inglés)
- mDA** – Neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo
- MSX1/2** – Gen Homeótico Msh 1 y 2 (siglas en inglés)
- MZ** – Zona del Manto (siglas en inglés)
- NeuN** – Antígeno del Núcleo Neuronal (siglas en inglés)
- NGN2** – Neurogenina 2 (siglas en inglés)
- NSC** – Célula Troncal Neural (siglas en inglés)
- NURR1** – Receptor Nuclear Asociado 1 (siglas en inglés)
- OB** – Bulbo Olfatorio (siglas en inglés)
- OTX2** – Gen Homeótico Ortodenticle 2 (siglas en inglés)
- P-D** - Eje Próximo-Distal
- PCNA** – Antígeno Nuclear de Células en Proliferación (siglas en inglés)
- PITX3** – Gen Homeótico de la Pituitaria 3 (siglas en inglés)

**RA** – Ácido Retinoico (siglas en inglés)

**RAR** – Receptores de Ácido Retinoico (siglas en inglés)

**RARE** – Elementos de Respuesta a Ácido Retinoico (siglas en inglés)

**RPL13** – Proteína Ribosomal L 13 (siglas en inglés)

**RXR** – Receptor X de Retinoides (siglas en inglés)

**SEM** – Error Estándar de la Media (siglas en inglés)

**SHH** – Sonic Hedgehog

**SOX2** – SRY-box 2 (Sex determining Region Y-box 2, siglas en inglés)

**SVZ** – Zona SubVentricular (siglas en inglés)

**TdT** – Desoxinucleotidil transferasa terminal (siglas en inglés)

**TH** – Tirosin Hidroxilasa

**VZ** – Zona Ventricular (siglas en inglés)

**WNT** – Contracción de las palabras en inglés Wingless e Int-1



## **II. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS**

**Figura 1.** Modelos de Regeneración Animal

**Figura 2.** Anatomía externa del cerebro del ajolote

**Figura 3.** Regeneración del Palio Dorsal del telencéfalo del ajolote

**Figura 4.** ERGs a lo largo del eje rostro-caudal del cerebro del ajolote

**Figura 5.** Especificación del tubo neural, y la formación de los centros organizadores

**Figura 6.** Redes génicas que controlan el desarrollo embrionario del mesencéfalo-rombencéfalo y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro del ratón.

**Figura 7.** Vía de señalización del Ácido Retinoico

**Figura 8.** Protocolo de PCR utilizado en el Termociclador

**Figura 9.** Las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran localizadas en los Bulbos Olfatorios, Telencéfalo y Mesencéfalo Ventral

**Figura 10.** Las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran distribuidas a lo largo del Diencéfalo Ventral del Ajolote

**Figura 11.** Las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran distribuidas a lo largo del Mesencéfalo Anterior del Ajolote.

**Figura 12.** No se detectaron neuronas TH<sup>+</sup> a lo largo del Mesencéfalo Posterior ni Rombencéfalo

**Figura 13.** Las neuronas TH<sup>+</sup> del Mesencéfalo son *Nurr1*<sup>+</sup> y *Vmat2*<sup>+</sup>

**Figura 14.** La inyección con 6µg/µl de 6-OHDA es la óptima para eliminar a las neuronas catecolaminérgicas

**Figura 15.** Las neuronas catecolaminérgicas son eliminadas a las 24 horas posteriores a la inyección intraventricular con 6-OHDA

**Figura 16.** La muerte neuronal asociada a la inyección de 6-OHDA es por vía apoptótica

**Figura 17.** Los progenitores neurales proliferan a las 24 hpi de 6-OHDA

**Figura 18.** La regeneración de las neuronas TH<sup>+</sup> se observa a los 10 días post-inyección de 6-OHDA

**Figura 19.** Las neuronas dopaminérgicas regeneradas a los 20 dpi son NeuN<sup>+</sup>

**Figura 20.** Durante la regeneración de las neuronas TH<sup>+</sup> se sobreexpresan genes asociados a diferenciación dopaminérgica

**Figura 21.** Inyecciones Intraperitoneales de RA aumenta la expresión de RAR $\gamma$  en el Mesencéfalo del ajolote

**Figura 22.** El aumento de los niveles de RA inhibe la expresión de los genes asociados a diferenciación dopaminérgica

**Figura 23.** Prueba de Oligonucleótidos en cDNA control de ajolote

**Figura 24.** Titulación de Anticuerpos en el Cerebro del ajolote

**Figura 25.** Neuronas TH<sup>+</sup> en el Bulbo Olfatorio y Telencéfalo Anterior

### ***III. RESUMEN***

El ajolote (*Ambystoma mexicanum*) es un tipo de salamandra con una gran capacidad para regenerar órganos como el cerebro, médula espinal, corazón, pulmones, y ojos; así como apéndices como las extremidades y la cola. En el caso del cerebro, se ha descrito la existencia de un tipo de células progenitoras neuronales llamadas células ependimogliales que son responsables de la neurogénesis homeostática y regenerativa en este organismo y en otras salamandras. Estas células proliferan tras la remoción completa del palio dorsal (homólogo al telencéfalo de los mamíferos), y dan lugar a la formación de los neuroblastos que regeneran la parte faltante 11 semanas después de la ablación, recuperando así todos los tipos neuronales encontrados a ese nivel.

Aunque se ha descrito la notable capacidad del ajolote para regenerar todos los tipos neuronales del telencéfalo, la diferenciación de las células ependimogliales y las vías de señalización que pueden estar regulando este proceso no están muy estudiadas. Por ello, en este proyecto, implementamos una ablación neuronal específica con una inyección intraventricular de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que se utiliza en otros modelos de mamíferos como los ratones para eliminar específicamente las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y crear un modelo de enfermedad de Parkinson.

Debido a la falta de estudios sobre la diversidad neuronal del mesencéfalo del ajolote, en la primera parte del proyecto estudiamos la distribución de las neuronas dopaminérgicas (DA) con una inmunodetección en el cerebro completo. Como resultado, se encontró que las neuronas DA se encuentran en los bulbos olfatorios, el telencéfalo y el mesencéfalo ventral (diencéfalo y mesencéfalo), lo que indica una localización conservada de estas neuronas a lo largo de los vertebrados.

Dado que el mayor número de neuronas DA se encontraban en el mesencéfalo ventral, se inyectó 6-OHDA intraventricularmente y se encontró que el tratamiento induce la muerte neuronal dopaminérgica específica después de 6 horas post-inyección (hpi) demostrada por el ensayo TUNEL, y observando una ablación DA completa después de 48 hpi. Al mismo tiempo, encontramos un aumento en la proliferación de progenitores neuronales indicando la activación de estas células durante la regeneración de las neuronas DA.

Después, se encontró que las neuronas DA comienzan a reaparecer 10 días post-inyección (dpi) con una regeneración completa a los 20 dpi. Durante este tiempo, se detectó

un aumento de la expresión de genes asociados a progenitores neuronales como *Sox2* y *Ngn2*, así como de genes implicados en la diferenciación dopaminérgica como *Foxa2*, *Lmx1a/b*, *Cxcr4*, *Nurr1* y *Pitx3*. Sin embargo, sólo a los 20 dpi las neuronas DA presentaron marcadores de diferenciación. Esto indica que el proceso de diferenciación de las células endimogliales hacia el destino DA es similar al que ocurre durante el desarrollo embrionario y tarda más de 10 días en completarse; visualizando la regeneración completa a los 20 dpi.

En la última parte del proyecto, se buscó modular la diferenciación neuronal durante la regeneración de neuronas DA aumentando los niveles de ácido retinoico que ha sido demostrado en trabajos previos que incrementa la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales en otros organismos. Tras la ablación de neuronas DA a las 24 hpi de 6-OHDA, se inyectó intraperitonealmente una solución de ácido retinoico y se encontró que la expresión de genes asociados a progenitores neuronales aumentaba más que durante la diferenciación normal. Sin embargo, la expresión de genes relacionados con la especificación y determinación de la identidad DA disminuye, lo cual indica que el ácido retinoico puede estar implicado únicamente en la proliferación de los progenitores neuronales y al mismo tiempo inhibir su diferenciación.

Este proyecto señala la importancia de estudiar la regeneración de un tipo neuronal a la vez ya que permite entender el proceso de diferenciación de las células troncales/progenitoras neuronales, su comportamiento y mecanismos de regulación para poder encontrar formas de modular el proceso de regeneración neuronal *in situ*.

#### ***IV. ABSTRACT***

The axolotl (*Ambystoma mexicanum*) is a type of salamander that can regenerate organs such as the brain, spinal cord, heart, lungs, eyes, and appendages such as limbs and tail. In the brain, there are reports of a type of neuronal progenitor cells called ependymogial cells responsible for homeostatic and regenerative neurogenesis. These cells proliferate after the complete removal of the dorsal pallium (analogous to the mammalian telencephalon) and give rise to neuroblasts that regenerate the missing part 11 weeks after the damage, recovering all the neuronal types found at that level.

Although the axolotl's remarkable capacity to regenerate all the neuronal types of the telencephalon has been described, the differentiation of the ependymogial cells and the signal pathways that may be regulating this process still needs to be studied. For that, in this project, we implemented one specific neuronal ablation with an intraventricular injection of 6-hydroxidopamine (6-OHDA), which is used in mammals to eliminate specifically the midbrain dopaminergic neurons and create a Parkinson's disease model.

Because there is a lack of study about the neuronal diversity of axolotl's midbrain, in the first part of the project we studied the distribution of dopaminergic (DA) neurons in the whole brain by whole-mount immunostaining. As a result, we found that DA neurons are in the olfactory bulbs, telencephalon, and ventral midbrain (diencephalon and mesencephalon), indicating the conserved localization of these neurons along the vertebrates.

The highest number of DA neurons were found in the ventral mesencephalon, so we injected 6-OHDA intraventricularly and found that the treatment induced the specific dopaminergic neuronal death after 6 hours post-injection (hpi) demonstrated by TUNEL assay with a complete DA ablation after 48 hpi. Interestingly, at the same time, we found an increase in the proliferation of neuronal progenitors indicating the importance of these cells in the regeneration of DA neurons.

Next, we found that DA neurons begin to reappear ten days post injection (dpi), being fully regenerated at 20 dpi. During this time, there is an increased expression of neuronal progenitor genes such as *Sox2* and *Ngn2*, genes involved in differentiating dopaminergic cell fate such as *Foxa2*, *Lmx1a/b*, *Cxcr4*, *Nurr1*, and *Pitx3*. However, only at 20 dpi, only the DA neurons present differentiation markers. This indicates that the differentiation process of the

ependymoglia cells to DA fate is similar to embryonic development and takes more than ten days to be completed, visualizing the settled regeneration at 20 dpi.

In the last part of the project, we searched to modulate neuronal differentiation during DA neuron regeneration by increasing the levels of retinoic acid. After DA neuron ablation at 24 hpi of 6-OHDA, we injected a retinoic acid solution intraperitoneally and found that the expression of neuronal progenitors increased more than during normal regeneration at 48 hpi. However, the expression of genes related to the specification of neuronal progenitors and the determination of DA identity is decreased, indicating that retinoic acid may only be involved in the proliferation of neuronal progenitor cells and inhibiting their differentiation.


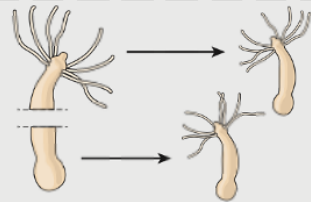
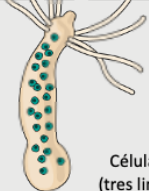

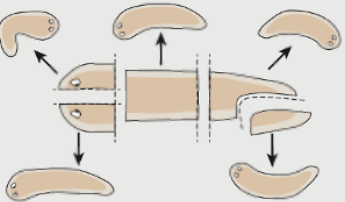
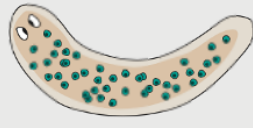

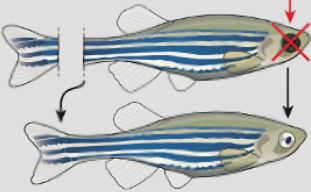
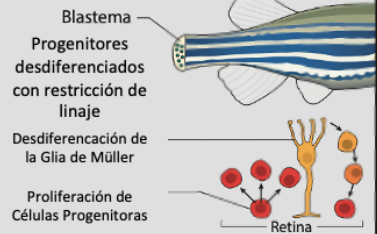

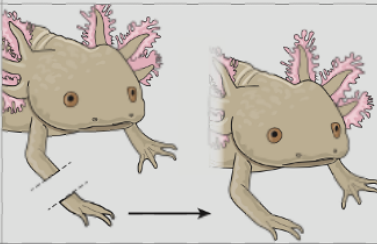


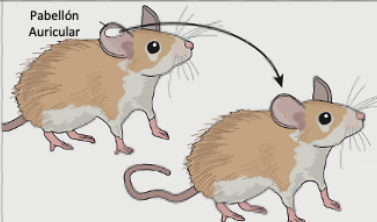

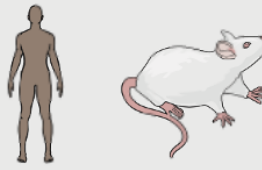
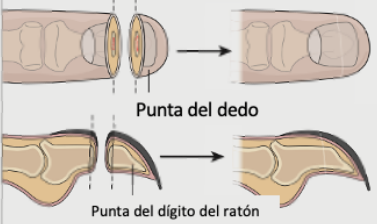
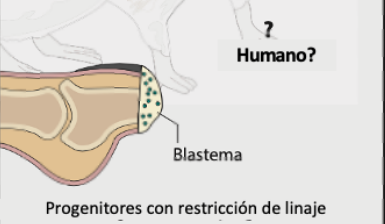
This project points out the importance of studying the regeneration of one neuronal type at a time as we can figure out the differentiation process of the neural stem/progenitor cells, and the same methodology can allow us to modulate different cellular events to elucidate their regulation, and thus finding ways to modulate the neuronal regeneration process *in situ*.

## V. *INTRODUCCIÓN*

### 1. **REGENERACIÓN**

La regeneración es la habilidad que tiene un organismo de generar nuevas células, tejidos u órganos como parte del remplazo celular fisiológico del mismo o tras una lesión ocasionada por el ambiente externo. Es un proceso natural que se encuentra codificado y orquestado por un conjunto de factores de transcripción, metabolitos y moléculas estructurales que dirigen la proliferación, crecimiento, morfogénesis y diferenciación celular coordinados estrechamente en tiempo y espacio.

En la naturaleza, la capacidad de regeneración se encuentra distribuida en varios organismos. Las plantas, por ejemplo, se pueden regenerar completamente a partir un tejido adulto, de una masa de células desorganizadas denominada “callo”, o incluso de una sola célula totipotente (Long et al., 2022). En el reino animal, las manifestaciones de los procesos de regeneración han sido mayormente estudiadas encontrando una variabilidad en las capacidades de regeneración dependiendo del organismo (**Figura 1**). Se ha descrito la capacidad de regeneración del organismo completo en algunos invertebrados como la *Hydra* y la planaria (Dwight et al., 1767; Lehnhoff et al., 1744), la capacidad de regenerar órganos y apéndices como el pez cebra al poder regenerar aletas, corazón y el tejido neural (revisado en: Gemberling et al., 2013), o las salamandras que pueden regenerar extremidades, médula espinal, la retina de los ojos, entre otros órganos (Miller et al., 2019). En los mamíferos, algunos ejemplos de las capacidades de regeneración se han descrito en las diferentes capas de la piel y la aurícula del oído en el ratón espinoso de África (Gawriluk et al., 2016; Seifert et al., 2012), el remplazo anual de la cornamenta de los venados machos (Goss & Powel, 1985; Qin et al., 2023), y la limitada capacidad de regeneración de la punta de los dedos en los humanos sólo si estos son amputados en la parte distal del lecho ungueal (Dolan et al., 2018). También se ha descrito que los humanos podemos regenerar partes sustanciales del hígado; sin embargo, la forma y vascularización del tejido regenerado es significativamente diferente (revisado en: Manco et al., 2018).

	Modelo	Paradigma de Regeneración	Origen Celular
Regeneración de Organismo Completo	 <b>Hydra</b> ( <i>Hydra</i> spp.)		 Células Troncales Adultas (tres linajes independientes)
	 <b>Planaria</b> ( <i>Schmidtea mediterranea</i> )		 Células Troncales Adultas (Pluripotentes y Multipotentes)
Regeneración de órganos o apéndices	 <b>Pez Cebra</b> ( <i>Danio rerio</i> )	Luz, Fármacos, Genética, y Ceguera Quirúrgica 	 Blastema Progenitores dediferenciados con restricción de linaje Dediferenciación de la Glia de Müller Proliferación de Células Progenitoras Retina
	 <b>Salamandra</b> ( <i>Ambystoma</i> spp.)		 Blastema Progenitores con restricción de linaje
Regeneración de tejido complejo	 <b>Ratón espinoso africano</b> ( <i>Acomys</i> spp.)	Pabellón Auricular 	 Blastema Progenitores con restricción de linaje?
	 <b>Humano</b> <i>(Homo sapiens)</i> / <b>Ratón</b> <i>(Mus musculus)</i>	 Punta del dedo Punta del dígito del ratón	 Blastema ? <b>Humano?</b> Progenitores con restricción de linaje

**Figura 1. Modelos de regeneración animal.** (Arriba) Animales como la hidra y las planarias tienen la capacidad de regenerar el cuerpo completo, y mantienen de manera constante un reservorio de células troncales. (Medio) Animales como la salamandra o el pez cebra pueden regenerar apéndices u otros órganos complejos. Aunque sus órganos son muy parecidos al de los mamíferos, esos animales responden al daño al dediferenciar células a progenitores con restricción de linaje capaces de construir nuevos tejidos complejos. (Abajo) Aunque los mamíferos tenemos capacidad de regeneración limitada, hay evidencia de regeneración en algunos órganos y apéndices; hasta ahora se ha demostrado que ocurre por la formación de blastemas. Imagen modificada y traducida de: (Duncan & Sánchez Alvarado, 2019).



Las diferentes formas de regeneración se pueden clasificar en periódica, no periódica, y restringida dependiendo del contexto en que sucede la regeneración (revisado en: Sasidharan & Sánchez Alvarado, 2022). La regeneración periódica es cuando se da el reemplazo celular como parte de la homeóstasis de los tejidos. Entre los tejidos con recambio continuo se encuentra el exoesqueleto de los crustáceos, la muda de piel en reptiles, o el recambio de epitelios como la piel, el intestino o el endometrio de los mamíferos (Fitzgerald et al., 2021; Tanaka & Reddien, 2011). Este tipo de regeneración ayuda a mantener el número óptimo de células en el órgano al reemplazar células muertas; y en todos los casos estudiados hasta ahora, está llevado a cabo por células troncales residentes en cada órgano. Así se han identificado las células troncales intestinales, pulmonares, endometriales, y otros tipos de troncales epiteliales que cada cierto tiempo llevan a cabo divisiones simétricas y asimétricas cuya progenie se diferencia en las células a reemplazar (Montagnani et al., 2016). Dentro de la misma categoría, los invertebrados como las hidras y planarias tienen regeneración periódica en forma de reproducción asexual que también es mediada por las células troncales residentes en cada uno de los organismos. Las planarias, por ejemplo, se reproducen por fisión, un proceso que dirige al animal a desprender un fragmento posterior de su cuerpo que resulta en un fragmento anterior y un fragmento posterior que proceden a regenerar la parte faltante y, últimamente, en la formación de dos individuos (Arnold et al., 2019).

La regeneración no periódica es activada tras una lesión o estrés del organismo. Ejemplos de la regeneración no periódica son la regeneración del cuerpo completo desencadenados por organismos protistas unicelulares como Stentor, fragmentos de planaria, hidra y ascidias cuando son lastimadas y amputadas; y la regeneración de extremidades y aletas como en las salamandras y peces tras su amputación, respectivamente (Gierer, 2012; Jeffery, 2015; Morgan, 1901; Pfefferli & Jaźwińska, 2015). Un aspecto clave durante la regeneración no periódica de los apéndices de vertebrados es la formación del blastema, una estructura especializada compuesta de células mesenquimales rodeadas de una capa epitelial (Seifert & Muneoka, 2018). La formación de esta estructura se observa en varios procesos de regeneración unos días después de la amputación de las aletas de los peces como el pez cebra o *Polypterus* (Cuervo et al., 2012; Gemberling et al., 2013), tras la amputación de extremidades en ajolotes y otros tipos de salamandras, así como la amputación completa de

sus colas (Gearhart et al., 2015; Gerber et al., 2018). De la misma manera, se pueden observar la formación de blastemas durante la regeneración de invertebrados. Tras una lesión en el gusano hemicordado *Ptychodera flava* o de la planaria *Schmidtea mediterranea* se forma una estructura especializada primero al cerrar la herida por la epidermis seguido de una acumulación de células mesenquimales por debajo del epitelio (Gurley et al., 2008; Luttrell et al., 2016). Sin embargo, no toda la regeneración periódica ocurre por la formación del blastema ya que se ha descrito que en los vertebrados, el corazón, hígado y cerebro no desarrollan blastemas canónicos tras una lesión (Eguchi et al., 2011; Sasidharan & Sánchez Alvarado, 2022).

Los ejemplos antes mencionados de la regeneración periódica y no periódica involucran principalmente la proliferación y diferenciación de células troncales y/o progenitoras. Sin embargo, hay excepciones a la regla donde los procesos de regeneración no son llevados a cabo por este tipo de células, sino por procesos de desdiferenciación o transdiferenciación de las células existentes dentro del tejido dañado. La desdiferenciación es un proceso donde las células pierden su estado diferenciado al dejar de expresar genes críticos para la función de un tipo celular en específico y pasan a un estado indiferenciado (Grafi, 2009). Esta pérdida de expresión génica es a través de la reprogramación celular, facilitando así la proliferación o la diferenciación de otros tipos celulares existentes en el tejido. Dentro de algunos ejemplos donde ocurre la desdiferenciación celular durante el proceso de regeneración se encuentra la regeneración de los ojos de los tritones (Eguchi et al., 2011), y la regeneración de las extremidades y la cola del ajolote (Echeverri & Tanaka, 2002; Lo et al., 1993). Así, la regeneración no periódica es usualmente inducida por una lesión o amputación, y se pueden llevar a cabo con o sin la formación de blastemas, por la activación de células troncales/progenitoras, o por la desdiferenciación/transdiferenciación de células preexistentes en el tejido para restaurar las estructuras faltantes.

Por último, la regeneración restringida se debe a que algunos organismos poseen la capacidad de reemplazar y restaurar tejidos durante algún momento de su desarrollo. Uno de los ejemplos más conocidos de regeneración restringida es la habilidad de *Xenopus* de regenerar la cola en etapas larvarias (Godwin & Rosenthal, 2014) que disminuye al llegar a

etapas más avanzadas (entre las etapas 45 y 47), y que se pierde después de la metamorfosis (Gibbs et al., 2011). En los mamíferos, la regeneración restringida se ha observado en la capacidad de regeneración cardíaca sostenida en ratones neonatos siguiendo la resección apical del corazón o el infarto al miocardio a los dos días de nacimiento (Porrello et al., 2011; Z. Wang et al., 2019), cuya habilidad no se encuentra en organismos adultos. Por el contrario, se ha propuesto que las capacidades de regeneración de las salamandras como el ajolote disminuyen conforme a la longevidad del organismo (Bryant et al., 2017); sin embargo, hay estudios que contradicen estas ideas, al demostrar que la capacidad de regeneración de estos animales también ocurre en animales longevos (Eguchi et al., 2011), muy probablemente por la capacidad de resistencia al envejecimiento, al presentar eventos de senescencia celular despreciables a lo largo de su vida (revisado en: Yun, 2021).

Hoy en día existe el conocimiento sobre la diversidad de formas en que se presenta la capacidad de regeneración en los seres vivos; sin embargo, los descubrimientos sobre nuevas especies y las diferencias en los procesos de regeneración que se encuentran en ellos, evidencia que aún falta mucho por conocer sobre este proceso. Caracterizar los mecanismos que son críticos para la regeneración significará un avance para estudiar la biología de estos procesos y con ello tener un impacto a futuro al llevarlo a la práctica a través de la medicina regenerativa.

## **2. REGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (CNS)**

El Sistema Nervioso Central (CNS, por sus siglas en inglés) de los vertebrados está compuesto por el cerebro y la médula espinal. Lesiones físicas y procesos de envejecimiento en el cerebro conllevan una pérdida progresiva y funcional de las neuronas y glía que terminan en un daño irreversible al CNS y/o al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. En los mamíferos, dicha pérdida de función se debe a la incapacidad del CNS adulto de regenerar. Un grado limitado de autoreparación del CNS existe en el desarrollo embrionario temprano; sin embargo, la habilidad de regenerar es dramáticamente disminuida después del nacimiento (revisado en: Varadarajan et al., 2022).

Aunque se tenía conocimiento que muchos de los órganos de los mamíferos retienen una población de células somáticas que pueden responder a las condiciones homeostáticas o de daño, al producir nuevas células para la homeostasis del tejido o para procesos de reparación, el cerebro había sido considerado como una excepción. Se asumía que el cerebro adulto sólo contenía progenitores que generan células gliales, pero que las neuronas sólo podían ser formadas durante el desarrollo embrionario (Cajal & May, 1991). Esto fue así hasta que se sugirió que la adición de nuevas neuronas podía ocurrir en múltiples regiones del cerebro de un mamífero adulto incluyendo el hipocampo, bulbos olfatorios, y la corteza cerebral (Altman, 1962; Altman & Das, 1965). Se ha demostrado que la neurogénesis ocurre en algunos vertebrados adultos ya que estudios en aves cantoras se han identificado la formación de nuevas neuronas que se integran al núcleo responsable del control de su canto teniendo la misma morfología y propiedades electrofisiológicas de las neuronas que reemplazaron (Burd & Nottebohm, 1985; Paton & Nottebohm, 1984). Esto llevó a la demostración de la existencia de las Células Troncales Neurales (NSC, por sus siglas en inglés), y a su profundo estudio. La presencia de NSC de mamífero y la adición de nuevas neuronas al nervio olfatorio o al hipocampo ha sido confirmado posteriormente (Gonçalves et al., 2016; Lim & Alvarez-Buylla, 2016).

En el cerebro adulto de los mamíferos, las NSCs se han conocido con varios nombres: astrocitos radiales, células radiales parecidas a glía, células radiales, o progenitores neurales del tipo 1 (Obernier & Alvarez-Buylla, 2019). La localización de estas células ha sido descrita en dos puntos neurogénicos importantes del ratón. La primera es la Zona Ventricular y la Zona Subventricular de las paredes de los ventrículos laterales. Aquí, los progenitores primarios son la fuente de neuronas jóvenes que migran distancias largas, entre 2 a 8 mm, al nervio olfatorio, donde contribuyen a la discriminación de olores finos y la asociación de recompensa a olores (Grelat et al., 2018; Li et al., 2018; Lledo & Saghatelian, 2005). El segundo punto neurogénico es la Zona Subgranular del hipocampo. Aquí se generan nuevas neuronas excitatorias que van al giro dentado, donde juegan un papel importante en el aprendizaje, memoria y separación de patrones (Ming & Song, 2011). Otro aspecto importante para revisar es que existe una activación de las NSC de estos nichos neurogénicos tras un daño (revisado en: Patel & Sun, 2016; Sun, 2016). Sin embargo, las capacidades de plasticidad no son altas en los organismos adultos. Hasta este punto, se puede comentar que

el cerebro del mamífero adulto tiene una capacidad de regeneración periódica restringida a estos dos sitios neurogénicos, principalmente.

Por otro lado, se ha descrito una mayor capacidad de regeneración del CNS de los vertebrados en otras especies como los peces teleósteos y los anfibios (revisado en: Lust & Tanaka, 2019). En el caso de los peces teleósteos se ha estudiado la capacidad de regeneración en varias especies teniendo como mayor representante al pez cebra *Danio rerio*. En el pez cebra se ha descrito la capacidad de regeneración del telencéfalo, del tectum óptico y del cerebelo. En el cerebro de los teleósteos se han encontrado dos tipos de células troncales o progenitoras que median la regeneración: la primera son las células gliales radiales que se comportan como NSC, ya que actúan como progenitores multipotentes y tienen capacidad de autorenovación (Rothenaigner et al., 2011). Tras una lesión la glía radial aumenta su proliferación, incrementando sus divisiones simétricas y asimétricas llevando a última estancia al remplazo de las células perdidas (Barbosa et al., 2015; Kroehne et al., 2011; März et al., 2011). Por otro lado, en otras especies de teleósteos se han identificado progenitores neuroepiteliales que están restringidos a los límites del tectum óptico, proliferan en condiciones homeostáticas, e incrementan su proliferación después de una lesión (Lindsey et al., 2019).

Dentro de los anfibios anuros, la capacidad de regeneración del cerebro se describió por primera vez al remover los hemisferios cerebrales de las ranas africanas *Xenopus laevis* donde se observó la formación de una masa cerebral que contenía nuevas células nerviosas (Danielewsky, 1890). Hasta ahora, se ha descrito que *Xenopus* puede regenerar las regiones del telencéfalo, y del tectum óptico solamente durante los estadios larvarios (Filoni & Gibertini, 1969; Srebro, 1958; Yoshino & Tochinai, 2004), ya que estas capacidades de regeneración y cierre de herida están ausente en adultos (Srebro, 1965). Tras el daño al telencéfalo y al nervio óptico se observa una proliferación de progenitores neurales positivos a la proteína de unión al RNA Mushashi-1 y la proteína SRY-box-2 (**SOX2**), que conducen a la diferenciación y formación de neuronas N- $\beta$ -tubulina positivas (McKeown et al., 2013; Yoshino & Tochinai, 2004). Estas células progenitoras radican en las zonas ventriculares de cada respectiva región del cerebro, muy similar a las salamandras y peces teleósteos. Por otra

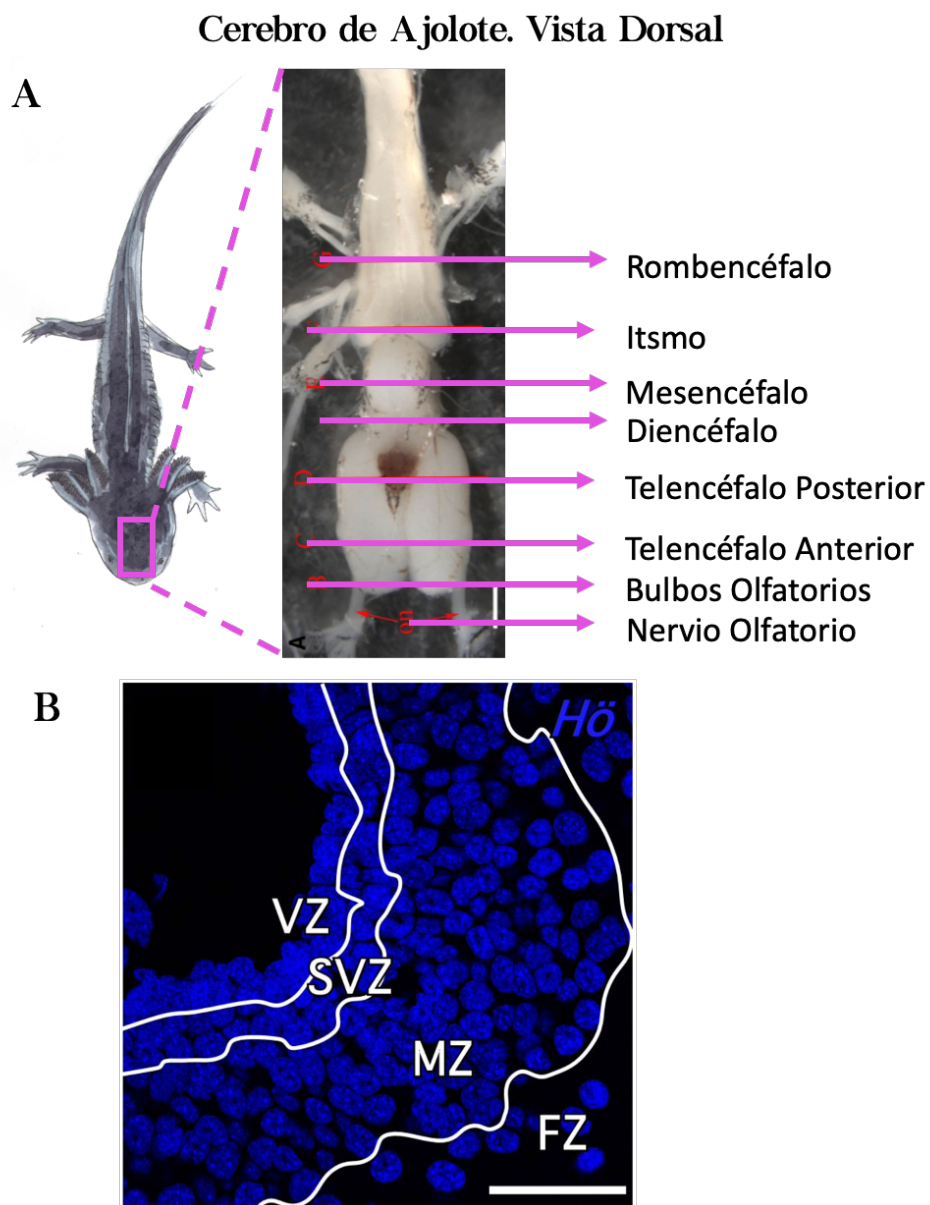
parte, al contrario que los anfibios anuros que pierden (o disminuye drásticamente) la capacidad de regeneración tras la metamorfosis, los anfibios urodelos, como las salamandras y tritones, mantienen sus capacidades de regeneración a lo largo de toda su vida.

### **3. EL AJOLOTE COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN DEL CNS**

Se considera que el cerebro de los urodelos es un representante del patrón básico del cerebro de los tetrápodos. Aunque éste presenta una organización simplificada de neuronas debido a la escasa migración radial que tienen durante el desarrollo embrionario, presenta la formación de una densa capa de sustancia gris en la que los núcleos y otras estructuras anatómicas pueden ser reconocidas como condensaciones locales (Fritsch & Himstedt, 1980; Herrick, 1927, 1948; Marín et al., 1997a, 1997b; Moreno & González, 2007; Northcutt & Kicliter, 1980). En él se distinguen todas las subdivisiones básicas del CNS de los vertebrados así como las regiones principales dentro de cada una de las partes: prosencéfalo (formado por dos bulbos olfatorios, el telencéfalo y el hipotálamo), diencéfalo, mesencéfalo, tronco encefálico (istmo y rombencéfalo) y médula espinal (Nerea Moreno, 2007; Morona & González, 2008, 2009) (**Figura 2-A**).

Según la posición relativa y el empaquetamiento de los cuerpos neuronales, es posible distinguir cuatro zonas en el CNS de urodelos adultos desde la superficie apical (en contacto con el ventrículo) a la lámina basal (hacia las meninges). La zona ventricular (**VZ**, por sus siglas en inglés) se compone de células que están en contacto con el líquido cefalorraquídeo, la adyacente zona subventricular (**SVZ**, por sus siglas en inglés) se compone de una o dos filas de células densamente empaquetadas, mientras que en la zona del manto (**MZ**, por sus siglas en inglés), las células se encuentran más dispersas y más aisladas en la zona de fibras (**FZ**, por sus siglas en inglés) (**Figura 2-B**). Estas cuatro zonas coinciden con zona endimaria o periventricular, zona subendimaria, gris central y sustancia blanca, respectivamente de la salamandra *Ambystoma tigrinum* previamente descritas (Herrick, 1948). Para caracterizar con relativa precisión las principales zonas del CNS de los urodelos se han basado en estudios de la organización neuroquímica de los distintos sistemas sensoriales, el análisis de su conectividad, tanto en el adulto como en el desarrollo, así como

por estudios de anatomía comparada con otras especies (Gonzalez & Smeets, 1991; Agustín González & Smeets, 1992; Lazcano et al., 2021; López, 2003; N. Moreno et al., 2002; Nerea Moreno, 2007; Morona & González, 2008).



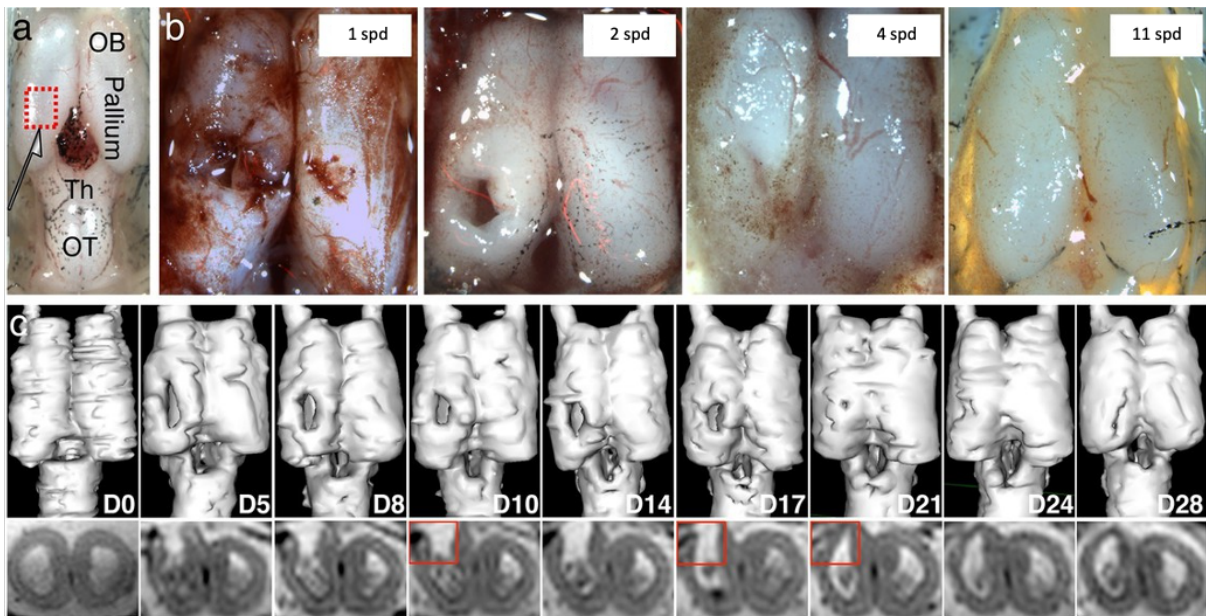
**Figura 2. Anatomía externa del cerebro del ajolote.** A) Vista dorsal del cerebro del ajolote donde se marcan con flechas las estructuras anatómicas a lo largo del eje rostro-caudal. Imagen modificada de (Maden et al., 2013). B) Tinción de Höechst (núcleos) en una sección del telencéfalo donde se observa las diferentes zonas a lo largo del eje medio-lateral. VZ: Zona Ventricular; SVZ: Zona Subventricular; MZ: Zona del Manto; FZ: Zona de Fibras. Escala 100  $\mu$ m. Imagen modificada de (Urata et al., 2018).

Los primeros estudios sobre regeneración del cerebro de salamandras datan de 1916 cuando Harold Burr encontró que la regeneración del telencéfalo ocurría en larvas de ajolote (Burr, 1916). Esta capacidad también fue encontrada en ajolotes adultos (Kirsche & Kirsche, 1964), que, aunque podían recuperarse de una lobectomía, la resección de un hemisferio completo del telencéfalo no regeneraba en este organismo (Kirsche & Kirsche, 1964). Al igual que en *Xenopus*, se ha demostrado que el nervio olfatorio juega un papel crucial durante la regeneración del telencéfalo (Kirsche & Kirsche, 1964; Maden et al., 2013). Remoción del nervio olfatorio bloquea la regeneración del telencéfalo hasta que este se reconecta a la parte restante del telencéfalo. Esto llevó a la conclusión que el nervio olfatorio era la fuente de las células progenitoras encargadas de la regeneración que migraban al telencéfalo dañado y lo regeneraba (Wenk & Winkelmann, 1972). Sin embargo, estudios más recientes proponen que el nervio olfatorio provee las señales para estimular la proliferación de progenitores neurales localizados en las zonas aledañas al daño en el telencéfalo (Maden et al., 2013). La naturaleza de estas señales, y cómo llegan a los progenitores para iniciar y regular la regeneración aún no se ha estudiado. Lo que sí se ha estudiado es que la remoción del palio dorsal del telencéfalo de un ajolote adulto tarda 11 semanas en regenerar (**Figura 3**). Dicha regeneración recupera todos los tipos neuronales encontrados antes del daño, aunque se ha visto que las conexiones (conectoma) no está del todo recuperado (Amamoto et al., 2016).

Un análisis a detalle sobre las dinámicas de proliferación celular en el cerebro del ajolote utilizando la incorporación de análogos de timidina, descubrió que las células Ependimo-Radial-Gliales (**ERG**, por sus siglas en inglés) (también llamadas endimogliales), que se encuentran en la VZ, era la población de células que más lo incorporaban por estar en constante división celular. Dado que la progenie de las células ERGs se diferenciaba a diferentes tipos neuronales, y su distribución es a lo largo de todo el eje rostro-caudal del CNS del ajolote, se ha hipotetizado que estas son las células troncales neuronales en estos organismos (Maden, 2013). Estas células tienen la expresión en común de SOX2, y de la proteína ácida fibrilar glial (**GFAP**, por sus siglas en inglés), además, sus procesos radiales se posan en la superficie pial del cerebro. Estas células son progenitores neuronales en el cerebro adulto del ajolote ya que su progenie migra de forma radial y da lugar a las neuronas diferenciadas de la SVZ, ZM y ZF detectadas por el marcaje del Antígeno del



Núcleo Neuronal (**NeuN**, por sus siglas en inglés) (Becker & Becker, 2015; Maden et al., 2013) (**Figura 4**).



**Figura 3. Regeneración del Palió Dorsal del Telencéfalo del ajolote.** (*Arriba*). Imágenes representativas bajo estereoscopio sobre el daño al telencéfalo y la progresión de su regeneración tras varias semanas post-daño (spd). (*Medio*) Reconstrucciones tridimensionales por imágenes de resonancia magnética (MRI) donde indica que al día 21 post-daño se cierra la herida. (*Abajo*) Secciones coronales por MRI a diferentes tiempos de regeneración. Imagen modificada de (Amamoto et al., 2016).

La participación de las células ERGs se ha descrito en diferentes contextos neurogénicos como el desarrollo embrionario, el crecimiento larvario, la regeneración periódica y la regeneración no periódica del CNS del ajolote (Amamoto et al., 2016; Fei et al., 2014; Lust et al., 2022; Maden et al., 2013; Wei et al., 2022). También, estudios clonogénicos *in situ* han podido dilucidar que las ERGs son las Células Troncales Neurales que residen en la VZ de todo el CNS del ajolote (Lust et al., 2022). Dado que las células ERGs participan en varios contextos neurogénicos, se realizaron estudios de single cell RNA-seq donde confirmaron la identidad común de las células ERGs al expresar genes de células indiferenciadas como *Sox2*, *Gfap*, y *Nes*, y al mismo tiempo demostraron la heterogeneidad de estas células al identificar 3 subpoblaciones cuya diferencia radica en la expresión de algún marcador único como la población *Ccnd1*<sup>+</sup> (CCND1RGC), *Sfrp1*<sup>+</sup> (SFRP1RGC) y *Wnt*<sup>+</sup> (WNTRGC) (Lust et al., 2022; Wei et al., 2022). La demostración de la heterogeneidad de las células ERGs a lo largo

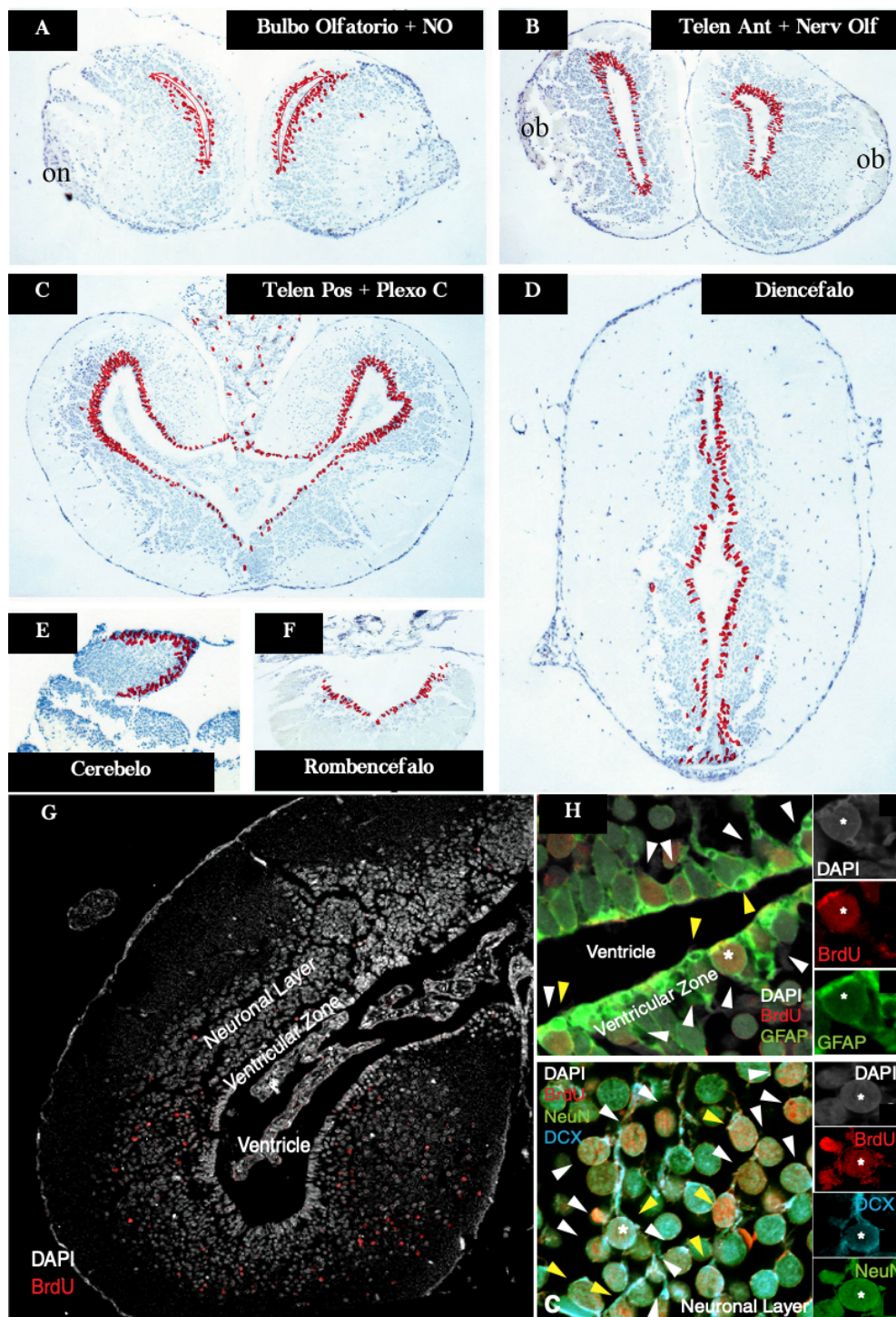
del SNC abre preguntas para indagar sobre las diferencias entre las subpoblaciones de las células ERGs, ya que cada grupo podría estar especializado para cada zona anatómica del cerebro, para responder a contextos neurogénicos diferentes e incluso que puedan ser una población de progenitores diferentes para cada tipo neuronal existente en el cerebro.

El papel de regeneración no periódica de las células ERGs en el CNS del ajolote ha sido caracterizado únicamente a nivel de telencéfalo y médula espinal (Amamoto et al., 2016; Lust et al., 2022; Sabin et al., 2019; Walker et al., 2022). Hasta ahora, es incierto si los mismos progenitores neurales median la regeneración a nivel del cerebro medio (diencéfalo, mesencéfalo), o rombencéfalo. Es importante investigar sobre las diferencias de regeneración a diferentes niveles del eje rostro-caudal del cerebro del ajolote ya que se ha demostrado que tienen diferentes tasas de proliferación homeostática (Maden et al., 2013), aunado a que la heterogeneidad de las células ERGs también puede existir en estos niveles. Por otro lado, en ningún estudio sobre la regeneración del CNS del ajolote estudian los procesos de diferenciación que llevan a cabo las células ERGs. Esto llega a ser complicado ya que en ambas lesiones (remoción del palio dorsal del telencéfalo, y corte de médula espinal) se eliminan más de un tipo celular, lo que implica que estudiar los procesos de especificación y determinación celular sean complicados de realizar.

Por esta razón, en este proyecto se busca estudiar los procesos de diferenciación celular de las ERGs, al sólo eliminar un tipo neuronal de forma específica. En el mesencéfalo de la salamandra *Pleurodeles waltl* se han inyectado de forma intraventricular neurotoxinas que eliminan específicamente a las neuronas sin evocar un trauma cerebral mayor (Joven & Simon, 2018). Así la inyección de 6-hidroxidopamina (**6-OHDA**) se ha usado anteriormente para eliminar las neuronas dopaminérgicas con anterioridad en salamandras adultas observando su regeneración a los 40 días post-inyección (dpi) (Berg et al., 2010; Parish et al., 2007). Entre los mecanismos con los que la 6-OHDA promueve la muerte neuronal se encuentran: 1) La autooxidación intra o extracelular de 6-OHDA que favorece la formación de Peróxido de Hidrógeno y la formación de los radicales Superóxido e Hidroxilil; 2) La Formación de Peróxido de Hidrógeno por la acción de la Monoamina Oxidasa; y 3) la Inhibición directa de los Complejos I y IV mitocondriales de la cadena transportadora de

electrones que al final llevan, entre otros acontecimientos, al rompimiento del DNA y la apoptosis celular (Glinka et al., 1997). Esta misma neurotoxina ha sido utilizada en mamíferos como modelo de la enfermedad de Parkinson, al eliminar selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta (Mendes-Pinheiro et al., 2021), y usarlos como base para la implementación de terapias de reemplazo celular (Björklund & Parmar, 2021).

Para estudiar los procesos de diferenciación de las células ERGs hacia un linaje dopaminérgico del mesencéfalo, es importante revisar lo que ocurre durante el desarrollo embrionario, ya que dichos eventos podrían recapitularse durante la regeneración.



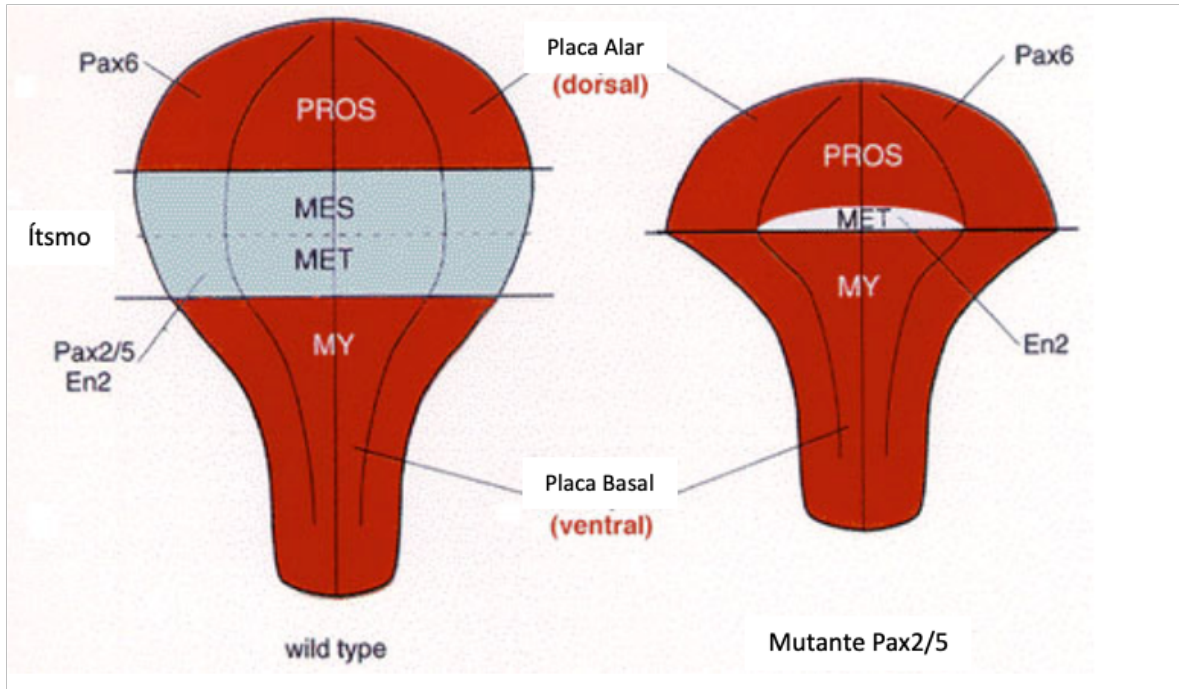
**Figura 4. Células ERGs a lo largo del eje rostro-caudal del cerebro del ajolote. (E-F).** Incorporación de BrdU en un cerebro adulto de ajolote en condiciones homeostáticas. Se observa el marcaje de las células en la VZ del Bulbo Olfatorio (A), Telencéfalo Anterior (B), Telencéfalo Posterior (C), Diencefalo (D), Cerebelo (E) y Rombencefalo (F). (G) Tras dos semanas las células BrdU<sup>+</sup> migran de la VZ a las capas neuronales (SVZ, MZ, y FZ). (H superior) Las células de la VZ BrdU<sup>+</sup> también son GFAP<sup>+</sup>, y (H inferior) tras las dos semanas las células BrdU<sup>+</sup> pierden el marcaje de GFAP adquiriendo el marcaje de diferenciación NeuN<sup>+</sup>. Las células Doblecortina (DCX, por sus siglas en inglés) DCX<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> se consideran células intermedias con el proceso de diferenciación por ser completado. Imagen modificada de (Maden et al., 2013).

#### 4. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SNC EN VERTEBRADOS Y DIFERENCIACIÓN AL LINAJE DOPAMINÉRGICO

El desarrollo embrionario de los organismos vertebrados comienza con la fusión de dos gametos para formar un cigoto. Posteriormente se forma la blástula y la gástrula en la que se establecen las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. El ectodermo es la capa germinal que formará la epidermis, así como el tejido neural (Hines & Marx, 1996). Después de la inducción neural primaria, el ectodermo comienza a transformarse en la placa neural durante el proceso de neurulación. La placa neural se estrecha, se alarga, y se pliega para permitir la fusión de las puntas más apicales de la placa neural y la formación del tubo neural (Hines & Marx, 1996). Posteriormente el tubo neural se regionaliza al formar las vesículas primarias que darán lugar al procéfaló, mesocéfaló y rombocéfaló. La identidad antero-posterior de cada vesícula primaria del cerebro se especifica desde la gastrulación por el mesodermo precordial y la notocorda y se estabiliza cuando se forma la placa neural. En la placa neural, los patrones de expresión de *Pax2*, *Pax5* y *Pax6* demarcan los primordios del cerebro medio y el cerebro anterior. En ratones doble knock-out de *Pax2* y *Pax5*, el primordio mesencefálico se encuentra totalmente ausente y la zona presuntiva del cerebro anterior se conecta directamente con el cerebro posterior. Como resultado, el tectum (región dorsal del cerebro medio) y el cerebelo (proveniente de la región dorsal del mesocéfaló) están ausentes. Al mismo tiempo, la expresión de *Pax6*, se expande tanto rostralmente desde el diocéfaló como caudalmente desde el proocéfaló (Gonçalves et al., 2016; Schwarz et al., 1999) (**Figura 5**).

El mesocéfaló de un organismo adulto alberga la mayor parte de las neuronas dopaminérgicas del CNS. Las regiones del cerebro posterior y del cerebro medio son definidas por el mesodermo precordial y la notocorda anterior. Dos genes que están expresados en estos tejidos mesodermales anteriores son *Lim1* y *Otx2*. Si alguno de estos genes no está, no se forma el cerebro anterior ni el cerebro medio (Acampora et al., 1995; Shawlot & Behringer, 1995). El proocéfaló está compuesto de 6 regiones neuroméricas llamadas prosómeros. Del prosómero p1 al prosómero p3 se delimita el diocéfaló, mientras que los prosómeros p4 al p6 delimitan el hipotálamo (ventralmente) y el telocéfaló

(dorsalmente). Las delimitaciones de los prosómeros coinciden con la expresión de varios genes que son importantes para la especificación neural. La frontera entre el prosómero p2/p3 es crítica para la formación del cerebro anterior. Esta frontera corresponde a la zona limitans, y es también la fuente de Sonic hedgehog (Rubenstein & Puelles, 1994). Otra de las regiones críticas para el desarrollo del cerebro medio es la frontera del diencéfalo/mesencéfalo que normalmente dan lugar a los tejidos del ístmo. Esta no es una frontera que se caracteriza por una morfología específica, pero está delimitada por la expresión de dos factores que se reprimen mutuamente: El gen Ortodenticle Homeobox 2 (**OTX2**), cuya expresión ocurre en el prosencéfalo y el mesencéfalo, y el gen específico de gastrulación y cerebro 2 (**GBX2**, por sus siglas en inglés) cuya expresión está restringida a la parte más anterior del romboencéfalo. *Otx2* y *Gbx2* controlan la expresión de dos morfógenos, *Wnt1* (Contracción del Inglés *Wingless* e *Int*) en el cerebro medio, y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 8 (**Fgf8**, por sus siglas en inglés) en el cerebro posterior. Las células en esta frontera adquieren la información posicional al interpretar el gradiente de concentraciones generada por la secreción de FGF8 en el ístmo ya que mayores concentraciones de FGF8 en el romboencéfalo llevan a un destino celular a neuronas del cerebro posterior, y concentraciones bajas de FGF8 en los tejidos aledaños, permite que las células adopten una identidad de cerebro medio (Gale & Li, 2008). De la misma manera, cuando se colocan perlas embebidas en FGF8 en el diencéfalo o rombencéfalo, se generan estructuras duplicadas en el cerebro medio (Crossley et al., 1996), al inducir la expresión de 3 genes en los tejidos aledaños: *Wnt1*, *Engrailed-2*, y *Fgf8*. Así mismo, *Wnt-1* y *Engrailed-2* son conocidos por ser importantes en la formación del cerebelo. Ratones deficientes en *Wnt1* carecen de las regiones del cerebro medio y del cerebelo (McMahon & Bradley, 1990; Thomas & Capecchi, 1990), ya que *Wnt-1* también mantiene la expresión de *Engrailed-2* en los precursores cerebelares, haciendo que proliferen (Danielian & McMahon, 1996; Dickinson et al., 1994).



**Figura 5. Especificación del tubo neural, y formación de los centros organizadores.** (A) Representación esquemática de las alteraciones encontradas en el ratón doble mutante Pax2/5 en la placa neural. En el ajolote wild-type la expresión de Pax5 (rojo) y Pax 2 y 5 (gris), delimita las tres regiones especificadas para la segmentación de las vesículas primarias en el futuro tubo neural: el prosencéfalo (PROS), el mesencéfalo/mielencéfalo (MSE/MET), y el rombencéfalo (MY). En el ratón doble mutante Pax2/5, la subdivisión de en medio está ausente, y sólo se encuentra un remanente en la región ventral que expresa Engrailed-2 y corresponde a la región basal del metencéfalo. Modificada y traducida de: (Schwarz et al., 1999).

Cuando el tejido del organizador ítsmico es transplantado al diencéfalo o rombencéfalo, induce a las células de su alrededor a diferenciarse a linajes característicos del mesencéfalo y del cerebelo, repectivamente (Bally-Cuif & Wassef, 1994; Marin & Puelles, 1994), y cuando esa misma región es rotada, se produce una triplicación del tejido neural ya que se induce la formación de los tejidos a ambos lados del transplante.

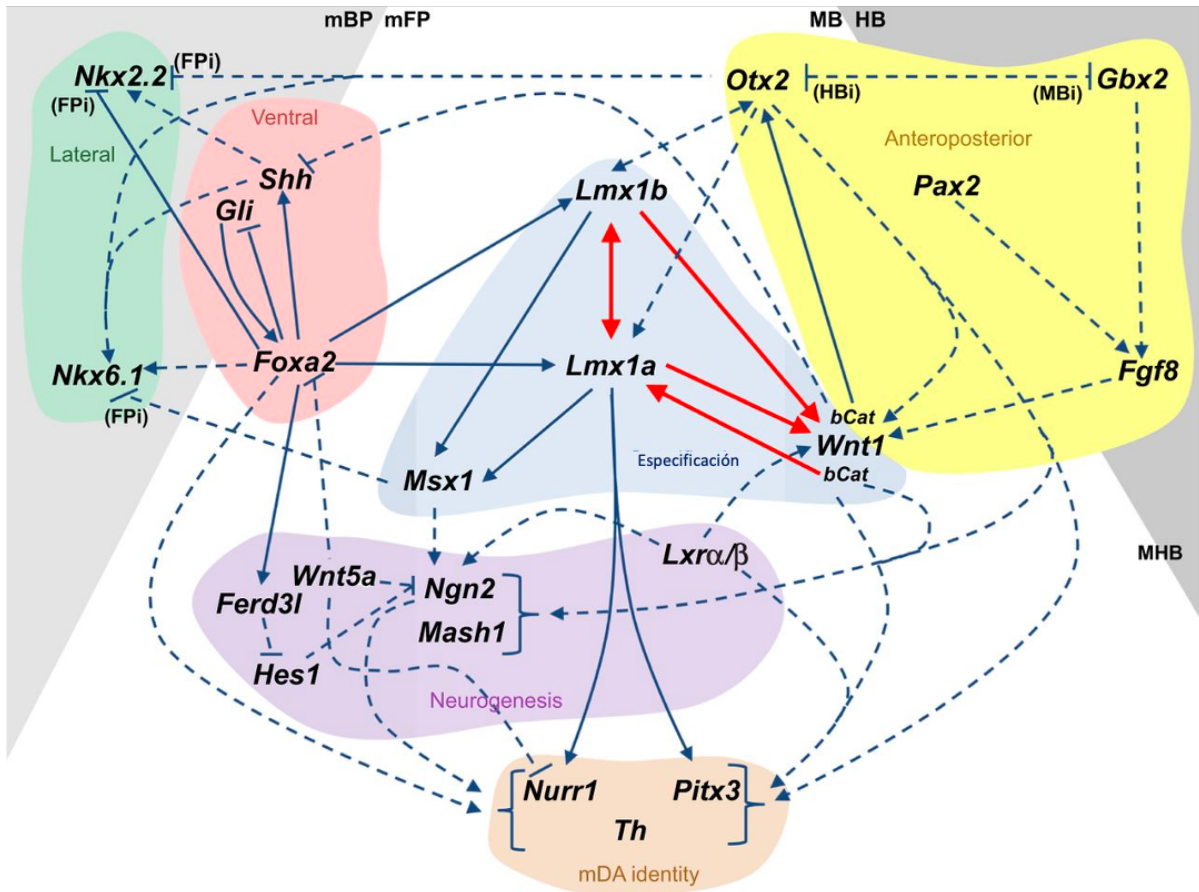
Una vez establecidos los centros organizadores en el tubo neural, se inicia el compromiso celular de los progenitores neurales y su diferenciación hacia los diferentes linajes del mesencéfalo, entre ellos el dopaminérgico. Las mismas señales de estos centros organizadores controlan múltiples funciones durante el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas, como la identidad regional del cerebro medio, la especificación y la

proliferación de los progenitores dopaminérgicos, la neurogénesis dopaminérgica, y su supervivencia (Arenas et al., 2015).

El compromiso de los progenitores neurales hacia linaje el dopaminérgico se da porque la región de la placa de piso del tubo neural secreta el morfógeno Sonic Hedgehog (SHH) (Gale & Li, 2008). SHH se encuentra expresado en la porción más ventral del mesencéfalo, donde se originarán las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, que en conjunto con la señalización proveniente del Organizador Ístmico inducen la expresión de factores de transcripción como el Factor de Transcripción 1 homeobox LIM A y B (**LMX1A**, **LMX1B**, por sus siglas en inglés), Neurogenina-2 (**NGN2**), el gen homeótico Msh 1 y 2 (**MSX1/2**) y el factor nuclear de hepatocito (**FOXA2**) que se encargan de que los progenitores de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo adquieran la especificación a dicho linaje (Hegarty et al., 2013).

Por último, los neuroblastos postmitóticos de la VZ se diferencian a neuronas dopaminérgicas mientras migran a la zona marginal. Durante el proceso de migración, los neuroblastos expresan emarcadores de identidad dopaminérgica como el receptor nuclear asociado 1 (**Nurr1**, por sus siglas en inglés) y el gen homeótico 3 de la pituitaria (**Pitx3**, por sus siglas en inglés). Al concluir, las neuronas dopaminérgicas diferenciadas tienen la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (**TH**, por sus siglas en inglés), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas y el transportador vesicular de monoaminas 2 (**Vmat2**, por sus siglas en inglés) (Arenas et al., 2015) que sirven como marcadores para identificar dichas neuronas. La expresión espacio-temporal de los genes antes mencionados controlan la adquisición progresiva y apropiada de los factores neurotróficos y el uso de dopamina como neurotransmisor (**Figura 6**).





**Figura 6. Redes genéticas que controlan el desarrollo embrionario del mesencéfalo-rombencéfalo y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro del ratón.** Establecimiento del patrón anteroposterior (*área amarilla*): Las actividades mutuamente represivas de OTX2 en el mesencéfalo (MB, por sus siglas en inglés) y GBX2 en el rombencéfalo (HB, por sus siglas en inglés) establecen el límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo (MHB), donde *Otx2* se inhibe en el rombencéfalo y *Gbx2* en el mesencéfalo. Especificación de la placa del piso del mesencéfalo (mFP, por sus siglas en inglés) (*área azul*): La expresión de LMX1B en la mFP del mesencéfalo regula directamente la expresión de *Wnt1* y *Lmx1a*, que también se regulan entre sí a través de CTNNB (*bCat*) o entre ellas (LMX1A), formando un bucle autorregulador (mostrado con flechas rojas). WNT1 regula *Otx2* y *Lmx1a* a través de  $\beta$ -catenina, y LMX1A/B regulan *Msx1* (red entre *Wnt1*-*Lmx1a/b*-*Msx1*). Patrón ventral (*área rosa*): FOXA2 regula *Shh*, que retroalimenta a FOXA2 a través de GLI (red entre *Shh*-*Foxa2*). FOXA2 también regula directamente *Lmx1a/b*, para coordinar la especificación de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Fenotipos laterales (*área verde*): Los marcadores de la placa basal del mesencéfalo (mBP, por sus siglas en inglés) (*Nkx2-2* y *Nkx6-1*) están inhibidos en la placa del piso del mesencéfalo (mFP, por sus siglas en inglés) por FOXA2 y OTX2 (*Nkx2-2*), y por MSX1 (*Nkx6-1*). Neurogénesis (*área púrpura*): La expresión de *Ngn2* está regulada indirectamente por WNT5A, FOXA2 (vía *Ferd3l* y *Hes1*), LMX1A/B (vía *Msx1*) y LXR alfa/beta (vía *Nr1h3/Nr1h2*). WNT1/ $\beta$ -catenina y OTX2 regulan tanto *Ngn2* como *Mash1*. Neuroblastos y diferenciación de neuronas dopaminérgicas (*área beige*): LMX1A regula directamente la expresión de genes postmitóticos de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (mDA por sus siglas en inglés), como *Nurr1* y *Pitx3*, que a su vez regulan *Th*. Estos genes postmitóticos también están regulados por FOXA2, NGN2, WNT5A, LXR alfa/beta, WNT1/ $\beta$ -catenina y OTX2. Las líneas continuas indican interacciones directas demostradas por inmunoprecipitación de cromatina. Todas las demás interacciones, directas o indirectas, se muestran con líneas discontinuas. Las puntas de flecha indican activación y las líneas perpendiculares, inhibición. Imagen modificada y traducida de (Arenas et al., 2015).

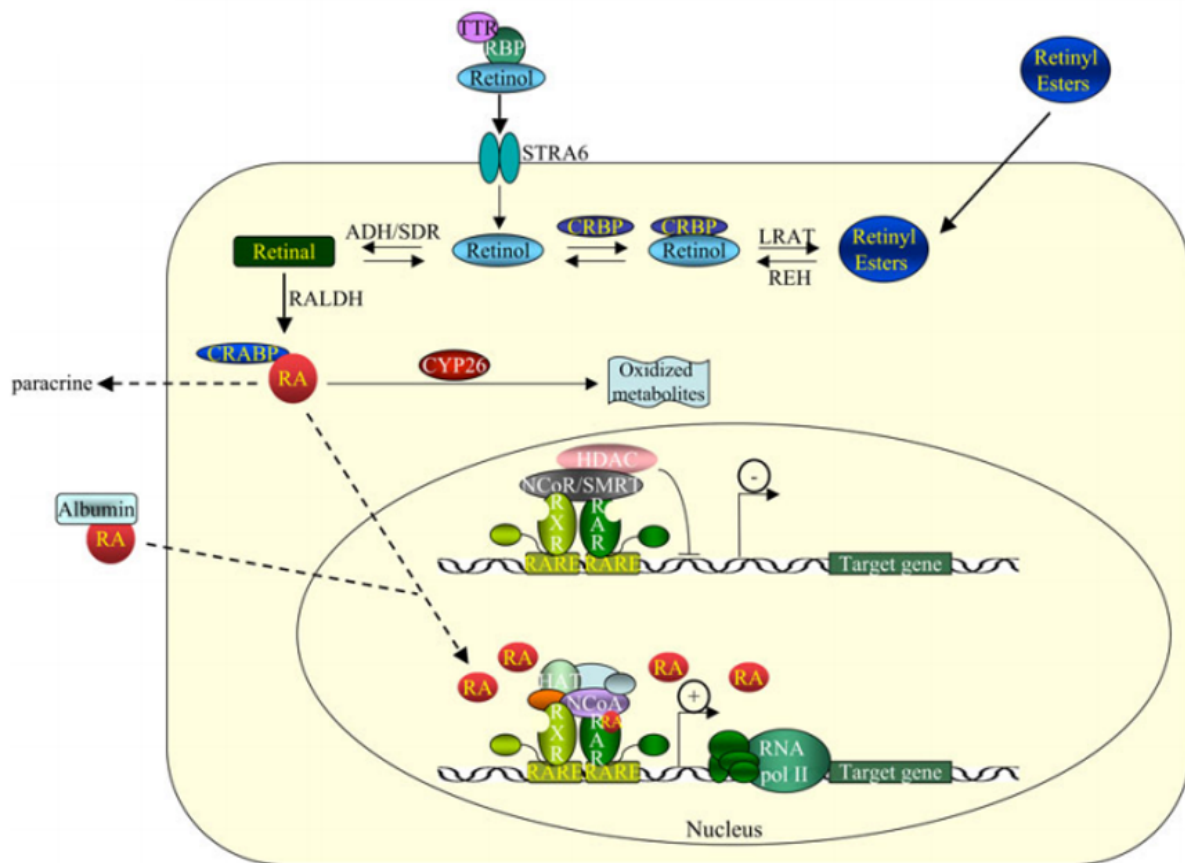
## 5. ÁCIDO RETINOICO Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DEL CNS

Los retinoides son análogos estructurales y funcionales de la vitamina A. Debido a que los vertebrados no podemos sintetizar la vitamina A, ésta se obtiene mediante la ingesta de alimentos en forma de retinoil, ésteres de retinol o beta-carotenos. El retinol es oxidado por la enzima retinol deshidrogenasa para formar retinal; subsecuentemente, el retinal es oxidado de manera irreversible para formar all-trans ácido retinoico por la enzima retinaldehído deshidrogenasa. El ácido retinoico tiene seis formas biológicas activas que incluye el all-trans, 11-cis, 9,13-di-cis, 9-cis, y 11,13-di-cis, siendo la all-trans la forma fisiológica predominante (Theodosiou et al., 2010).

Una vez sintetizado, el ácido retinoico (RA, por sus siglas en inglés) puede viajar por la sangre unido al complejo de proteínas de unión a retinol-transtoretina (RBP-TTR, por sus siglas en inglés). Una vez que llega a la célula blanco, el RA deja el complejo RBP-TTR y difunde rápidamente por la membrana citoplasmática. En algunos tejidos, el complejo RBP-TTR es reconocido por el receptor de membrana STRA6. El flujo citoplásmico del RA es facilitado por miembros de la familia proteica de unión a lípidos intracelulares, CRABP1 y CRABP2. Una vez unida a estas proteínas, el RA es transportado a diferentes partes de la célula para realizar sus efectos biológicos o ser metabolizado (Ghyselinck & Duester, 2019) (**Figura 7**).

Los efectos biológicos del RA se dan al modificar la expresión de sus genes blanco a través de la activación de los receptores de ácido retinoico (**RAR**, por sus siglas en inglés) que actúan a su vez como factores de transcripción. Estos receptores se clasifican en dos subfamilias: los RAR y RXR. Los heterodímeros RXR/RAR son las unidades funcionales que transducen las señales de los retinoides, modulando positiva o negativamente la expresión de genes específicos uniéndose a secuencias específicas en el DNA conocidas como “Elementos de Respuesta a Ácido Retinoico” (**RARE**, por sus siglas in inglés). Una vez que el AR tuvo su acción sobre los complejos de receptores funcionales, es metabolizado

por enzimas de la familia del citocromo P450, subfamilia 26, también llamado Cyp26B1 (Maden, 2002; Theodosiou et al., 2010).



**Figura 7. Vía de Señalización del ácido retinoico.** El retinol llega a las células diana en un complejo con RBP y TTR, y se transporta al interior de la célula a través del receptor STRA6. En la célula diana, el retinol libre es oxidado a retinaldehído por las enzimas ADH/SDR en una reacción reversible. Una segunda oxidación irreversible es catalizada por RALDH y convierte el retinaldehído en RA, que se une a CRABP. El RA entra en el núcleo, donde los heterodímeros RAR/RXR se unen a los RARE y se asocian a un complejo correpresor. La unión del RA induce un cambio conformacional del heterodímero RAR/RXR que provoca la liberación de los correpresores, el reclutamiento de los coactivadores y el inicio de la transcripción. El RA es degradado y eliminado por las enzimas CYP26. **ADH:** Alcohol deshidrogenasa, **BCO-I:**  $\beta,\beta$ -caroteno-15,15'-monooxigenasa, **CRABP:** proteína de unión al ácido retinoico, **CRBP:** proteína celular de unión al retinol, **CYP26:** citocromo P450 familia 26, **HAT:** histona acetiltransferasa, **HDAC:** histona desacetilasa, **NCoA:** complejo co-activador, **NCoR:** complejo co-represor, **RALDH:** retinaldehído deshidrogenasa, **RBP:** proteína de unión al retinol, **REH:** retinil éster hidrolasa, **RNA pol II:** polimerasa II, **SDR:** deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, **SMRT:** mediador silenciador del ácido retinoico y del receptor de la hormona tiroidea, **STRA6:** gen estimulado por el ácido retinoico 6, **TTR:** transtiretina. Imagen Modificada y traducida de (Theodosiou et al., 2010).

La participación del RA durante el desarrollo embrionario es importante desde etapas muy tempranas. Después de la gastrulación, el mesodermo que se localiza por debajo de la placa neural es en sí misma derivado de una estructura conocida como “el organizador” (nodo de Hensen en embriones de pollo, nodo en mamíferos, y el organizador de Spemann en

anfibios). En dicho organizador se han identificado varias clases de señales, entre ellas el RA donde tiene un papel para inducir regiones posteriores en la placa neural (Maden, 2002). Posteriormente, el mesodermo paraxial es la fuente de RA que actúa a distancia en la placa neural o en el tubo neural y se localiza adyacente a la zona posterior del romboencéfalo. El RA se encuentra en dos gradientes opuestos de forma anterior y posterior desde la frontera entre el romboencéfalo y la médula espinal. Estos gradientes de RA contribuyen a la especificación celular a lo largo del eje Antero-Posterior (A-P) así como en el eje dorso-ventral (D-V) (Morriss-Kay et al., 1991). Una vez que se va regionalizando el tubo neural, la señalización del AR es utilizada de nuevo para propósitos de diferenciación neuronal.

Durante la diferenciación de los progenitores neurales en el tubo neural, estos migrarán y adquirirán su destino celular según la posición en que se encuentren a lo largo del eje D-V del tubo neural: en la región dorsal las neuronas sensoriales, en la región central las interneuronas, y las motoneuronas en la región ventral. Para generar este patrón hay tres señales que participan: SHH del piso ventral del tubo neural, un gradiente de la proteína morfogenética ósea (**BMP**, por sus siglas en inglés) del piso dorsal del tubo neural, y la señal del AR derivado de las somitas adyacentes (Maden, 2002).

Ratones deficientes de RA presentan una reducción en la diferenciación neuronal de la médula espinal, que también se refleja en una falta de expresión de progenitores neurales *Ngn1*+ y *Ngn2*. También, hay una falta de expresión de genes involucrados en la especificación de interneuronas y motoneuronas como son *Pax6*, *En1*, *Irx1*, *Nkx6.2* y *Olig2*, que concluyen la importancia del RA en la diferenciación de estos tipos de progenitores neurales y su diferenciación (Maden, 2002).

El hecho que el RA participe durante los procesos de establecimiento de los ejes A-P y D-V del tubo neural, así como en la diferenciación y proliferación de progenitores neurales durante el desarrollo embrionario, hace que sea un buen candidato para que su señalización se mantenga en sistemas adultos y sea importante durante procesos neurogénicos del CNS de los animales regenerantes.

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El ajolote es un organismo que tiene una gran capacidad de regeneración del CNS. Aunque se ha descrito la notable regeneración de todos los tipos neuronales del telencéfalo tras una remoción del palio dorsal, la diferenciación de las células endimogliales y las vías de señalización que pueden estar regulando este proceso no han sido estudiadas. En el mismo sentido, tampoco existen en la literatura trabajos que estudien la capacidad de regeneración del mesencéfalo que, en vertebrados, alberga uno de los núcleos más importantes de neuronas dopaminérgicas, cuya muerte y neurodegeneración está asociada a enfermedades como el Párkinson y depresión (Knopman et al., 2021). Por ello, en este proyecto, se propone la implementación de una ablación neuronal específica con una inyección intraventricular de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ya descrita en mamíferos y otros tipos de salamandras. De esta forma, se podrá tener un modelo de regeneración que permita el estudio de los eventos de especificación y determinación al linaje dopaminérgico durante la regeneración. De la misma manera, se puede brindar un modelo de estudio para modular diferentes vías de señalización *in vivo* de manera temporal.

Para entender el proceso de regeneración es importante revisar los procesos embrionarios involucrados en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas, ya que se podrían recapitular algunos de estos eventos para formar adecuadamente las estructuras faltantes. De la misma forma, es importante saber que durante el desarrollo del CNS de anfibios y mamíferos participan una gran variedad de moléculas, siendo una de ellas el RA (Maden, 2002). La importancia de esta forma activa de la vitamina A en el desarrollo y la diferenciación del SNC está demostrada por estudios donde la exposición en exceso de retinoides durante las primeras etapas del desarrollo produce anomalías en el cerebro y en las células derivadas de la cresta neural. Además de la importancia del AR en la morfogénesis del sistema nervioso, también se le ha descrito un papel en la regulación de la diferenciación de neuronas durante el desarrollo y el crecimiento axonal posterior a una lesión (Maden, 2002; Theodosiou et al., 2010).

Así, este proyecto busca estudiar la regeneración de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del ajolote adulto y las alteraciones en el compromiso celular de los progenitores neurales por modificaciones en la vía del RA al aumentar los niveles de esta molécula durante la regeneración.

## ***VII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN***

¿El mesencéfalo del ajolote es un buen modelo para estudiar la regeneración de neuronas dopaminérgicas?, y subsecuentemente, ¿El ácido retinoico tiene un efecto en la determinación del destino celular durante la regeneración de las neuronas dopaminérgicas?

## ***VIII. HIPÓTESIS***

Se puede eliminar específicamente las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del ajolote con la inyección de la neurotoxina 6-OHDA. Posteriormente, el aumento de los niveles de ácido retinoico acelerará la regeneración de las neuronas dopaminérgicas al aumentar los procesos de proliferación de los progenitores neurales y una reducción en el tiempo de los eventos de compromiso celular y diferenciación de los mismos.

## ***IX. OBJETIVO GENERAL***

Establecer el modelo de la inyección intraventricular de 6-OHDA en el mesencéfalo del ajolote, y determinar si el ácido retinoico modifica los procesos de regeneración de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio al aumentar la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales.

## ***X. OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

- Determinar la distribución de neuronas dopaminérgicas en el cerebro del ajolote.
- Determinar el tiempo de regeneración de las neuronas dopaminérgicas posterior a la ablación con 6-OHDA.
- Estudiar el proceso de diferenciación hacia linaje el dopaminérgico y sus cambios al modular la vía del ácido retinoico.

## ***XI. MATERIALES Y MÉTODOS***

### **1. Mantenimiento y manejo de ajolotes criados en cautiverio**

Se utilizaron ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) de 13 a 15 cm de longitud (medición de nariz a cola). Se mantuvieron en un acuario de 970 L de agua filtrada y aireación constante. Los parámetros del agua del acuario se mantuvieron en: pH de 6.8 a 7.2, Silicatos ( $\text{SiO}_3$ ): 0 – 0.03 partes por millón (ppm), Fosfatos ( $\text{PO}_4$ ): 0 – 0.03 ppm, Amonio ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ): 0 ppm, Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ): 0 – 0.1 ppm, Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ): 0 – 0.1 ppm, Dureza General (GH, por sus siglas en inglés “General Hardness”): 100 – 120 mg/L, y Dureza de Carbonatos (KH): 50 – 60 mg/L. Las mediciones de los parámetros se monitorearon cada semana.

Los ajolotes se alimentaron 3 veces a la semana con tubifex (*Tubificidae* o *Naididae*), filete de tilapia (*Oreochromis*) previamente tratados con metronidazol 1g/kg durante mínimo 5 horas, o comprimidos de alimento (Axolotl Sticks, Tropical) *ad libitum*. El alimento restante se limpió al siguiente día para evitar contaminaciones del agua del acuario.

### **2. Inyección intraventricular en el cerebro del ajolote**

Los ajolotes se anestesiaron con una solución de agua del acuario y tricaina (sal de etilo 3-aminobenzoato metanosulfonato) (Sigma-Aldrich, A5040) al 0.05% (peso/volumen) hasta que dejaron de responder a estímulos mecánicos. Una vez anestesiado, se colocó al ajolote en una caja Petri con una tela absorbente humedecida con Acriflavina (Bioma, Acrivelt) y Azul de Metileno (Bioma, All-Blue) y la solución anestésica para evitar infecciones. Posteriormente, se cubrió el cuerpo del ajolote con sanitas humedecidas con agua de filtro a excepción de la cabeza. La operación se realizó bajo un estereoscopio (Stemi DV4, Zeiss) donde primero se le realizó una herida en forma de “7” con un bisturí empezando en una zona cercana a las branquias derechas, se siguió la trayectoria de una línea recta horizontal hasta llegar a una zona cercana a las branquias izquierdas y se termina con otra línea recta oblicua a la primera en una zona cercana a los ojos. Con unas tijeras de disección se retiró el tejido subcutáneo para revelar el cráneo. Posteriormente se localizó la altura del tercer ventrículo y con un bisturí se cortó una ventana en el cráneo de 0.5 cm<sup>2</sup> aproximadamente. Después se colocó un capilar de vidrio (World Precision Instruments, Inc., TW100F-6)

previamente elongado por calor en un Puller (Sutter Instruments, P-1000) [Programa Utilizado: RAMPA: 435, a dos pulsos. Pulso 1: Heat: 460, Pull: 100, Vel: 18, Time: 120. Pulso 2: Heat: 438, Pull: 0, Vel: 15, Time: 240] y posicionado en un microinyector (Eppendorf, Cell Tram Oil). De esta manera se llegó al tercer ventrículo para inyectar 100 nl/g de masa de ajolote con 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) (Sigma Aldrich, H4381) diluida a diferentes concentraciones en L-ácido ascórbico (Sigma Aldrich, A-7506) 0.2 mg/ml. Como control de la inyección, se utilizaron cerebros inyectados solamente con el L-ácido ascórbico.

Ya realizada la inyección, se esperaron 2 min a que el fármaco difundiera en la zona de la inyección, y posteriormente se retiró el capilar. Para cerrar la herida se posicionó el cráneo y la piel en su posición original, y con la ayuda de la sangre periférica de los vasos sanguíneos aledaños, se juntó la piel para que cerrara la herida y se dejó al ajolote en reposo por 15 minutos sobre la Caja Petri con constante hidratación constante. Pasado ese tiempo se regresó al ajolote a un recipiente con agua de acuario para su recuperación. En este punto los ajolotes se mantuvieron en recipientes individuales hasta su sacrificio. Durante ese tiempo se realizaron cambios de agua completos cada dos días, y se alimentaron 3 veces a la semana con comprimidos/pellets.

### **3. Extracción de cerebro completo y cortes por congelación**

Los ajolotes se anestesiaron con una solución de agua de filtro y triclaína (sal de etilo 3-aminobenzoato metanosulfonato) (Sigma-Aldrich, A5040) al 0.05 % (peso/volumen) hasta que dejaron de responder a estímulos mecánicos. Una vez anestesiado, se retiró la piel y cráneo para exponer el cerebro completo. Una vez expuesto el cerebro, se sacrificó al ajolote por decapitación, e inmediatamente se cortaron los nervios olfatorios del extremo rostral, y el rombencéfalo a nivel caudal. Con ayuda de unas pinzas se extrajo el cerebro, se realizó un lavado rápido en PBS 1X, y se fijó en paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich, P6148) al 4% en PBS 1X por una noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno a Temperatura Ambiente (TA) con agitación, y se deshidrató con una solución de sacarosa (J.T. Baker, 4072-01) al 30% en PBS 1X por 24 h a 4° C. Posteriormente, se orientó e incluyó en Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura, 4583) donde se congeló y guardó en un ultracongelador a -70° C hasta el momento de cortarlo.



Los cortes se realizaron por criostato (Slee, MEV) a  $-21^{\circ}\text{C}$  con un grosor de  $20\ \mu\text{m}$ , y se montaron en laminillas tratadas previamente con grenetina. Para aumentar la eficiencia de adherencia de los cortes a los portaobjetos, las laminillas con los cortes se dejaron en una cámara de vacío a TA por una noche. Al día siguiente se guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las zonas del cerebro que se analizaron corresponden a los siguientes 10 cortes de  $20\ \mu\text{m}$  de grosor posteriores a la aparición del tercer ventrículo con la formación del mesencéfalo y el hipotálamo en la zona ventral.

#### **4. Inmunohistoquímica en cerebro completo (*Whole Mount*) del ajolote**

Los ajolotes se anestesiaron y se extrajeron los cerebros completos de ajolotes juveniles de 13 a 15 cm de longitud (medición de nariz a cola). Los cerebros se fijaron con PFA al 4% en PBS 1X por toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se lavaron 2 veces con PBS 1X, por 30 min cada uno a TA y agitación. Se deshidrataron con un gradiente ascendente de Metanol (J.T. Baker, 9070-02) en PBS (MetOH 20%/PBS 80%, MetOH 40%/PBS 60%, MetOH 60%/PBS 40%, MetOH 80%/PBS 20%, MetOH Absoluto I, MetOH Absoluto II), cada uno por 30 min a TA con agitación. Se aclararon con MetOH/DMSO (Sigma-Aldrich, D2650)/ $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (relación 4:1:1) por una noche a  $4^{\circ}\text{C}$  sin agitación y en oscuridad. Al día siguiente se lavaron 2 veces con MetOH Absoluto, 15 min cada uno a TA, con agitación. Se rehidrataron en un tren descendente de MetOH en PBS (MetOH 80%/PBS 20%, MetOH 60%/PBS 40%, MetOH 40%/PBS 60%, MetOH 20%/PBS 80%, PBS I, PBS II), cada uno por 30 min a TA con agitación. Se bloquearon los cerebros con la Solución de Bloqueo (Leche en polvo [Nestlé, Svelty Baja en Grasa] al 2%, Tritón X-100 [VWR, M143] 0.5%, en PBS) por 3 h a TA y con agitación. Se incubó el Anticuerpo Primario anti-TH (Millipore, AB152), 1:250 diluido en la Solución de Bloqueo por una noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación. Al día siguiente se lavaron 5 veces con la Solución de Bloqueo, 1 h cada uno a TA con agitación. Se incubó el Anticuerpo Secundario acoplado a Peroxidasa de Rábano (Invitrogen, 31460) 1:500 diluido en la Solución de Bloqueo toda una noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación. Al día siguiente se lavaron 5 veces con la Solución de Bloqueo, 1 hora cada uno a TA con agitación, y 2 veces más con PBS 1 h cada uno a TA con agitación.

La revelación de la marca se realizó con las soluciones del Kit de Substrato de la Peroxidasa (Vector Laboratories, SK-4100). Primero, se colocaron los cerebros en la solución de 3'-3'diaminobencidina (DAB)/NiCl<sub>2</sub> (por cada 5 ml de agua destilada se añaden 2 gotas de Stock Buffer Solution, 4 gotas de DAB, y 2 gotas de NiCl<sub>2</sub>) por 1 h a TA con agitación y en oscuridad. Posteriormente se reveló la marca con una solución fresca de revelado (por cada 5 ml de Agua Destilada se añaden 2 gotas de Stock Buffer Solution, 4 gotas de DAB, 2 gotas de NiCl<sub>2</sub> y 2 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 10 min a TA con agitación y oscuridad. Para parar la reacción enzimática, se sumergieron los cerebros en PFA 4% en PBS por una noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 2 lavados con PBS de 15 min cada uno a TA y agitación. Se deshidrataron los cerebros con un gradiente ascendente de Metanoles en PBS (MetOH 20%/PBS 80%, MetOH 40%/PBS 60%, MetOH 60%/PBS 40%, MetOH 80%/PBS 20%, MetOH Absoluto I, MetOH Absoluto II), cada uno por 30 min a TA con agitación. Se aclararon los cerebros con una solución de Bencil Alcohol (Sigma-Aldrich, 402834) / Bencil Benzoato (Sigma-Aldrich, B6630) (relación 1:1) toda la noche a TA, sin agitación y en oscuridad. Una vez aclarados se fotografiaron en un estereoscopio (Zeiss, AxioZoom.V.16) acoplado con una cámara (Zeiss, AxioCam 503).

## 5. Tinción de Nissl

Las laminillas con los cortes se dejaron atemperar 5 min a TA. Se lavaron 2 veces PBS 1X por 5 min cada uno a TA, y un lavado rápido con agua destilada a TA. Se colocaron durante 8 min en la solución de Violeta de Cresilo (**Anexo I**) a TA. Una vez teñidas se pasaron por un tren de EtOH ascendentes (EtOH 70%, EtOH 96%, EtOH Absoluto I, EtOH Absoluto II), por 3 minutos cada uno a TA. Se aclararon con 2 lavados de Xilol (J.T.Baker, 9490-02) (Xilol I y Xilol II) por 5 min cada uno a TA. Se montaron con Cytoseal 60 (Thermo Scientific, 8310-4) como medio de montaje y se dejaron secar por una noche a TA. Al día siguiente se fotografiaron en un estereoscopio (Zeiss, AxioZoom.V.16) acoplado con una cámara (Zeiss, AxioCam 503).

## 6. Inmunofluorescencias

Las laminillas con los cortes por crióstato se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 min cada uno a TA. Se recuperó el antígeno colocando las laminillas en una cámara húmeda con Buffer de Citratos “Immunoretiever” (Bio SB, BSB 0022) precalentado a 65°C por 40 min. Se dejaron atemperar por 5 min a TA y se lavaron dos veces con PBS 1X por 5 min cada uno. Se bloquearon con la Solución de Bloqueo: Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, A7906) 1%, peso/volumen en PBT (**Anexo I**) por 1 h a TA. Se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo a 4°C por toda una noche. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con PBS 1x por 5 min cada uno, y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS 1X por dos horas. Se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 min cada uno y se trataron con una solución de Sulfato de Cobre (CuSO<sub>4</sub>, J.T.Baker, M-31442) 1mM en Acetato de Amonio (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, J.T.Baker, 0596-01) 50mM a pH=5 por 20 min a TA. Por último, se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub>, PBS, Dapi (2 µgramos/ml) y H<sub>2</sub>O<sub>MQ</sub> por 5 min cada uno a TA, y se montaron con el medio de montaje para fluorescencia SlowFade (Invitrogen, S36963). En el **Anexo II** se encuentra la lista de Anticuerpos Primarios y Secundarios, así como de las diluciones utilizadas. Como los anticuerpos no son específicos a las proteínas de ajolote, fue necesario probar y titular las concentraciones a usar, así como validar el funcionamiento de las inmunofluorescencias en tejidos control (**Anexo VII**). Las inmunofluorescencias se visualizaron y fotografiaron en un microscopio confocal (Zeiss, LSM 5 Pascal) ubicado en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

## 7. Diseño de Sondas para hibridación en cadena *in situ* fluorescente (HCR-FISH)

El diseño de las sondas para la detección de los mRNAs de *Lmx1*, *Foxa2*, *Nurr1* y *Vmat2* por la técnica de Hibridaciones en Reacción en Cadena *in situ* Fluorescentes (HCR-FISH, por sus siglas en inglés) se realizaron de la siguiente manera: Primero se buscaron las secuencias del mRNA en la base de datos Axolotl-Omics (<https://www.axolotl-omics.org/>) y se guardaron en formato FASTA (.fa) con ayuda del Software SnapGene (Dormatics, SnapGene). Posteriormente se diseñaron las sondas usando Probegenerator (Seifert & Currie, 2023). Probegenerator (<https://probegenerator.herokuapp.com>) usa primero OligoMiner

(Beliveau et al., 2018) que genera 50 secuencias complementarias a la secuencia del mRNA de cada gen que caen dentro de rangos específicos de la temperatura de fusión y contenido de GCs. Cada candidato es filtrado en pares de secuencias separadas por 2 nucleótidos y después alineado con el Software BowTie2 (Langmead & Salzberg, 2012) contra la secuencia del genoma del ajolote 6.0-DD (Nowoshilow et al., 2018; Smith et al., 2019). Por cada mRNA a detectar se pidieron 50 pmol de un pool de 37 pares de sondas contra el mismo blanco (IDT-DNA Technologies). Una vez entregado, se resuspendieron con H<sub>2</sub>O-mQ a una concentración de 1µM y se almacenaron a -20°C. Los pools utilizados para la detección de cada mRNA se encuentran descritos en el **Anexo III**.

## **8. HCR-FISH acoplada con Inmunofluorescencia**

Las HCR-FISH se realizaron con criosecciones de cerebro de 50 µm de grosor, y se siguieron las instrucciones del proveedor (Molecular Instruments): Las laminillas se lavaron 2 veces con SSC 2X por 5 min cada uno a TA. Los tejidos se prehibridizaron con el Buffer de Hibridación por 30 min a TA, y se incubó la sonda diluida en el Buffer de Hibridación a una concentración de 10 nM en una cámara húmeda a 37°C por toda la noche. Al siguiente día se lavó la sonda 1 vez con el Buffer de Lavado de Sonda (BLS) por 10 min a 37°C en cámara húmeda, y se incubaron con concentraciones descendientes del BLS diluido en SSCT 5X (BLS 75%/SSCT 5X 25%, BLS 50%/SSCT 5X 50%, BLS 25%/SSCT 5X 75%, SSCT 5X 100%) por 15 min cada uno a 37°C en cámara húmeda, y un último lavado con SSCT 5X 100% por 5 min a TA. El tejido se preamplificó con el Buffer de Amplificación por 30 min a TA. Al mismo tiempo que se completaba el paso anterior, se linearizaron, en tubos diferentes de PCR, los hairpins h1 y h2 (correspondiente a cada sonda) al calentarlos por 90 seg a 95°C y dejándolos enfriar por 30 min a TA en oscuridad. Pasado ese tiempo se juntaron los hairpins h1 y h2 y se diluyeron con el Buffer de Amplificación a una concentración final de 60 nM. Dicha mezcla de hairpins linearizados se incubó en el tejido por una noche en oscuridad a TA. Al día siguiente se realizó un lavado rápido con SSCT 5X a TA, y dos lavados más con SSCT 5X por 30 min a TA cada uno.

Para acoplar la HCR-FISH con la inmunofluorescencia, terminando el último lavado con SSCT 5X, se incubó el tejido con la Solución de Bloqueo (BSA 1% en PBST [Tween-20 [Bio-Rad, 1706531]] 0.2%) por 30 min a TA, y se incubó el Anticuerpo Primario anti-TH

(Millipore, AB152) diluido en la Solución de Bloqueo por una noche a 4°C. Al día siguiente se lavó 3 veces con PBS 1X 5 min cada uno a TA, y se incubó el Anticuerpo Secundario diluido en PBS 1X y DAPI 0.02 mg/ml por 3 h a TA. Pasado ese tiempo se lavó 3 veces con PBS 1X 5 min a TA cada uno, y se montó con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, H-1000-10). Las sondas utilizadas en este trabajo, así como los iniciadores y su combinación específica con los hairpins utilizados se encuentran descrita en el **Anexo IV**.

## **9. TUNEL Acoplado a Inmunofluorescencia**

Las reacciones de TUNEL se realizaron con el kit DeadEnd™ Fluoremetric System (Promega, G3250). Las laminillas con los cortes se dejaron atemperar 5 min a TA. Se lavaron 2 veces PBS 1X por 5 min cada uno a TA, y un lavado rápido con agua destilada a TA. Posteriormente se sumergieron en PFA 4% en PBS 1X por 15 min a TA, y se lavaron 2 veces con PBS 1X por 5 min cada uno a TA. Se permeabilizaron con Proteinasas K (PK) 20 µg/µl diluido en PBT (**Anexo I**) por 15 min a TA, y se lavaron 1 vez con PBS 1X por 5 min a TA. Se detuvo la acción de la PK con PFA 4% en PBS 1X por 5 min a TA, y se lavaron 1 vez con PBS 1X por 5 min a TA.

En este punto se trataron unas laminillas con DNasa RQI como control positivo de la técnica: Primero se trataron con el Buffer de la Enzima 1X (Promega, M198A) por 5 min a TA, y posteriormente se incubaron con DNasa RQI (Promega, M610A) diluida en su respectivo Buffer 1X a una concentración de 10 U/mL por 10 min a TA. Se lavaron con agua destilada por 5 min a TA, y 1 vez con PBS 1X por 5 min a TA.

Todas las laminillas (experimentales y controles) se equilibraron con el Buffer de Equilibrio por 10 min a TA, y se incubaron con el mix de la Reacción de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT, por sus siglas en inglés) por 1 h a 37°C en una cámara húmeda y en oscuridad. Se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 min cada uno a TA.

Para acoplar TUNEL con inmunofluorescencia, las laminillas se incubaron con la Solución de Bloqueo (BSA 1% en PBST [Tween-20] 0.2%) por 30 min a TA, y se incubó el Anticuerpo Primario anti-TH diluido en la Solución de Bloqueo por una noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS 1X 5 min cada uno a TA, y se incubaron con el Anticuerpo Secundario diluido en PBS 1X y DAPI 0.02 mg/ml por 3 h a TA. Pasado ese

tiempo se lavaron 3 veces con PBS 1X 5 min a TA cada uno, y se montaron con medio de montaje Slow Fade TM (Invitrogen, S36963).

## **10.Extracción de RNA y Síntesis de cDNA**

Se extrajo el cerebro completo del ajolote, y se realizó un lavado rápido con PBS 1X. Posteriormente, con ayuda de un bisturí, se aisló el mesencéfalo y se removió el hipotálamo ventral, y se congeló el tejido en un ultracongelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de RNA. Para la extracción de RNA se utilizó el kit *NucleoSpin RNA* (Machery-Nagel, 740955) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA extraído se eluyó con 30  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAsas en un tubo Eppendorf de las mismas características. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y se verificó la integridad con una electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen, 16500) al 1% en buffer TBE, adicionado con 0.01% de Bromuro de Etidio (Ibi Scientific, IB0850). El gel se corrió a 70 mV durante 45 min en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, Mini Sub-Cell GT). La retrotranscripción se realizó a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA con la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega, M170A). El cDNA obtenido se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop, y se llevó a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O-MQ}$ .

## **11.Diseño de Oligonucleótidos para PCR Tiempo Real**

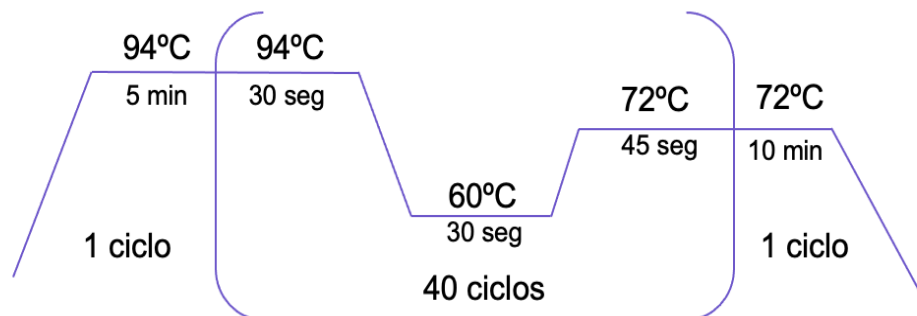
El diseño de las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las PCR Tiempo Real se realizó de la siguiente manera: Por cada gen a estudiar se llevó a cabo una búsqueda *tblastn* en la base de datos Axolotl-Omics usando como query inicial la secuencia de péptidos de un organismo filogenéticamente cercano al ajolote obtenido de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Por cada búsqueda se obtuvo una secuencia de cDNA la cual se guardó en formato FASTA (.fa). Con la secuencia FASTA de cada cDNA se diseñaron los oligos con el software del NCBI (NIH, gov), o el Software Primer3 (<https://www.primer3.ut.ee>), y se seleccionaron 2 pares de oligos por cada secuencia de cDNA. Para cada par de oligos se verificaron *in silico* los valores de la TM, porcentajes de CGs, y el posible autoaparamiento, con el Software Sequence Manipulator Suite

(<https://www.bioinformatics.org/sms2>). Las secuencias de cada par de oligos diseñados y seleccionados se encuentran en el **Anexo V**.

## 12. PCR en tiempo real

Se preparó una solución Stock con cada par de oligos de cada gen a analizar. En un tubo Eppendorf se puso, por cada reacción, 8.2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-mQ, 0.4  $\mu$ l del primer Forward (Fw) 10  $\mu$ M, y 0.4  $\mu$ l del primer Reverse (Rv) 10  $\mu$ M. Las secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados se encuentran en el apartado de **Anexo V**.

Para la reacción de PCR se añadió en otro tubo Eppendorf 10  $\mu$ l de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, 439155), 9  $\mu$ l de la solución Stock de primers correspondientes, y 1  $\mu$ l de cDNA 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l (a los controles sin cDNA, se les añadió 1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-mQ). Se homogeneizaron, y dicha solución se dividió en dos partes iguales para leerse por duplicado. Se procesaron en un termociclador (Qiagen, Rotor-Gen Q), siguiendo el protocolo programado que se muestra en la **Figura 8**. Se tomó como valor relativo al gen *Rpl13* (Proteína Ribosomal L13, Siglas en inglés), y a su vez se normalizó la expresión de cada gen con la expresión encontrada en el mesencéfalo del ajolote en condiciones homeostáticas, calculando así el doble delta Ct. Los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con el Software Prism 9 (GraphPad). Para cada gen se realizó una prueba t de Student de dos colas con un valor de  $\alpha=0.05$  comparando los valores del doble delta Ct contra 1 (valor normalizado). Se graficaron los promedios +/- el Error Estándar (SEM). Cada valor en las gráficas representa 3 experimentos independientes bajo las mismas condiciones. Todos los productos se amplificaron a una TM de 60° C.



**Figura 8.** Protocolo de PCR utilizado en el termociclador

### **13. Tratamiento con Ácido Retinoico**

Para los experimentos con tratamiento de RA, los ajolotes se anestesiaron con una solución de agua del acuario y tricaina (sal de etilo 3-aminobenzoato metanosulfonato) al 0.05% (peso/volumen) hasta que dejaron de responder a estímulos mecánicos. Posteriormente a cada ajolote se le inyectó intraperitonealmente 100 ó 150  $\mu\text{g}$  de ácido retinoico (Sigma-Aldrich, R2625) por gramo de masa de cada ajolote (Solución Stock: 50 mg/ml en DMSO). Posteriormente se regresó al agua para su recuperación. En este punto los ajolotes se mantuvieron en recipientes individuales por 2 días y se sacrificaron.

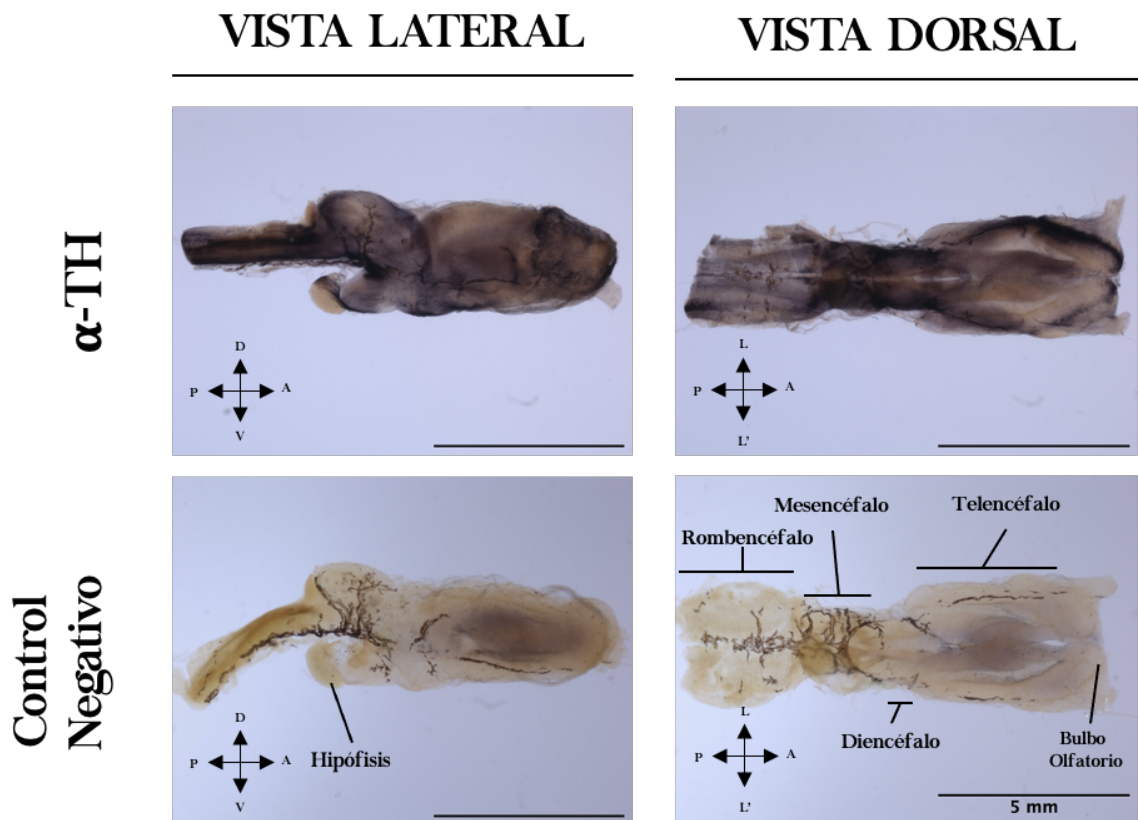
Para los experimentos donde se aumentan los niveles de ácido retinoico durante la regeneración de neuronas dopaminérgicas primero se inyectó de manera intraventricular la solución de 6-OHDA como se describió anteriormente y a las 24 se anestesiaron de nuevo con la solución de tricaina 0.05% (peso/volumen) hasta que dejaron de responder a estímulos mecánicos y se inyectó, de manera intraperitoneal una solución de ácido retinoico 150  $\mu\text{g}$ /gramo de masa del ajolote. Se regresaron a un recipiente con agua del acuario, y se sacrificaron a los 2, 5 y 10 dpi de la 6-OHDA.



## XII. RESULTADOS

### 1. Las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran localizadas en los bulbos olfatorios, telencéfalo y mesencéfalo ventral

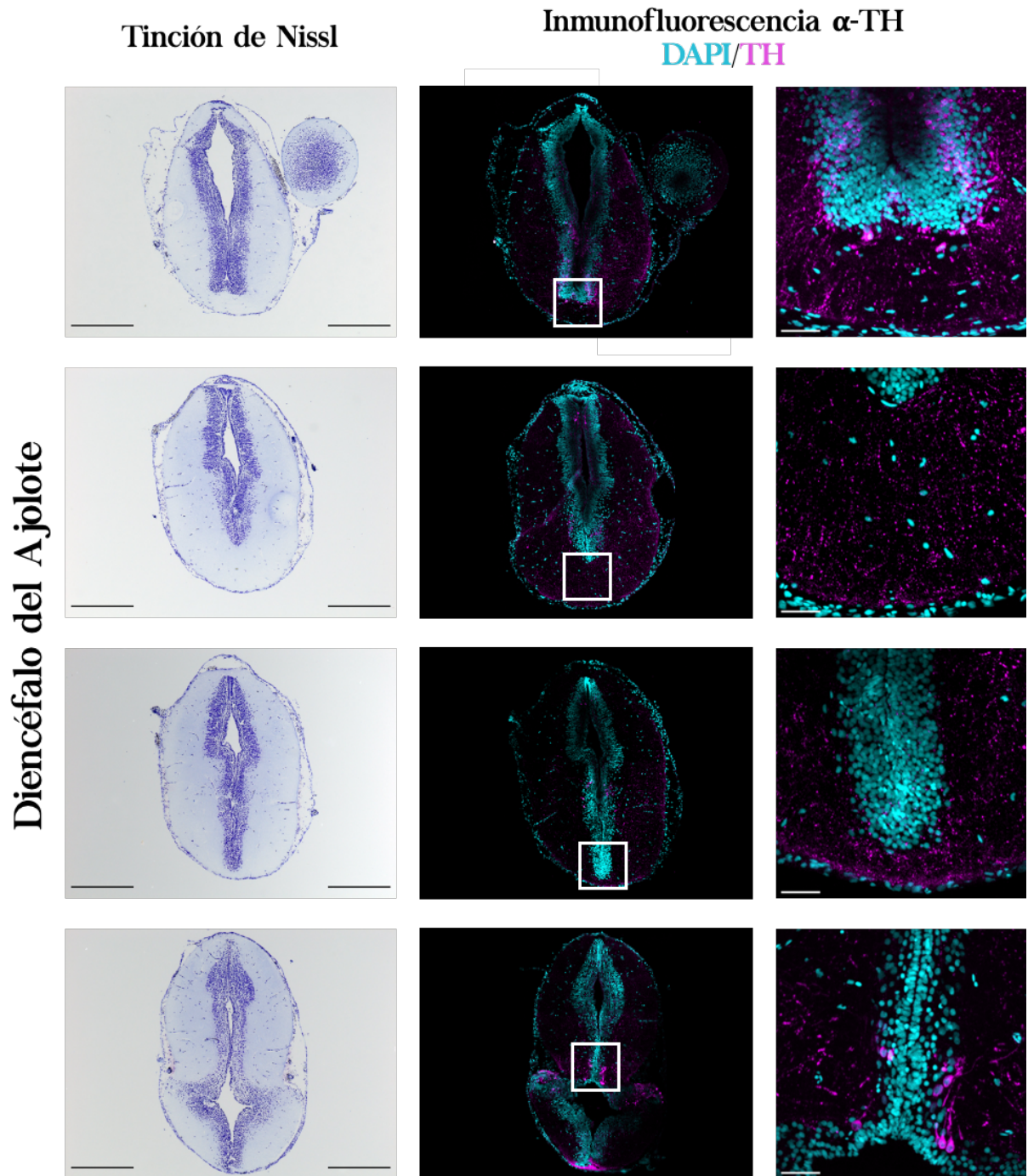
Como primera aproximación a la localización y distribución de las neuronas TH<sup>+</sup> en el cerebro del ajolote, se realizó una inmunohistoquímica para  $\alpha$ -TH en el cerebro completo (Figura 9). Como resultado se obtuvo la marca de TH localizada en los Bulbos Olfatorios (OB, por sus siglas en inglés), en el Telencéfalo, en el Cerebro Medio (Diencefalo y Mesencéfalo) ventral, el Rombencéfalo, y la frontera entre el Hipotálamo Caudal y la Hipófisis. Se resalta que las marcas observadas a nivel de los Bulbos Olfatorios y del cerebro medio son más densas y circulares, mientras que las marcas del Telencéfalo y Rombencéfalo tienen un aspecto fibrilar y de menos intensidad, posiblemente indicando los núcleos celulares y las prolongaciones citoplasmáticas (axones y dendritas) respectivamente.



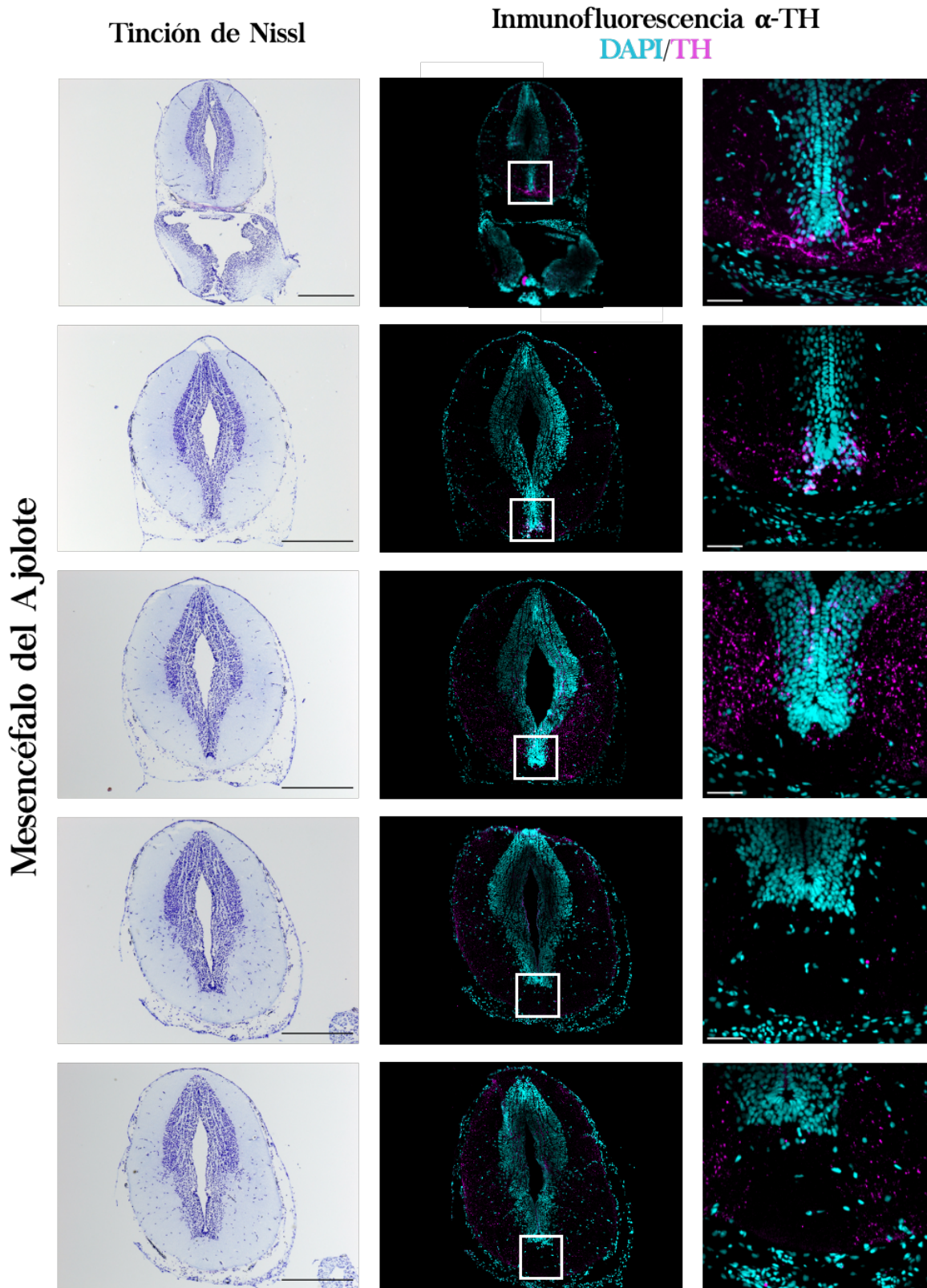
**Figura 9. Las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran localizadas en los Bulbos Olfatorios, Telencéfalo, y Mesencéfalo Ventral.** Inmunohistoquímica *Whole Mount* de cerebros marcados con el anticuerpo  $\alpha$ -TH, y su control negativo (sin anticuerpo primario). En la primera columna se observa la vista lateral del cerebro, y en la siguiente columna, la vista dorsal. D = Dorsal, V = Ventral, A = Anterior, P = Posterior, L = Latero, L' = Lateral.

## **2. Las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran localizadas en el Diencéfalo Ventral, y en la frontera entre el Diencéfalo y el Mesencéfalo**

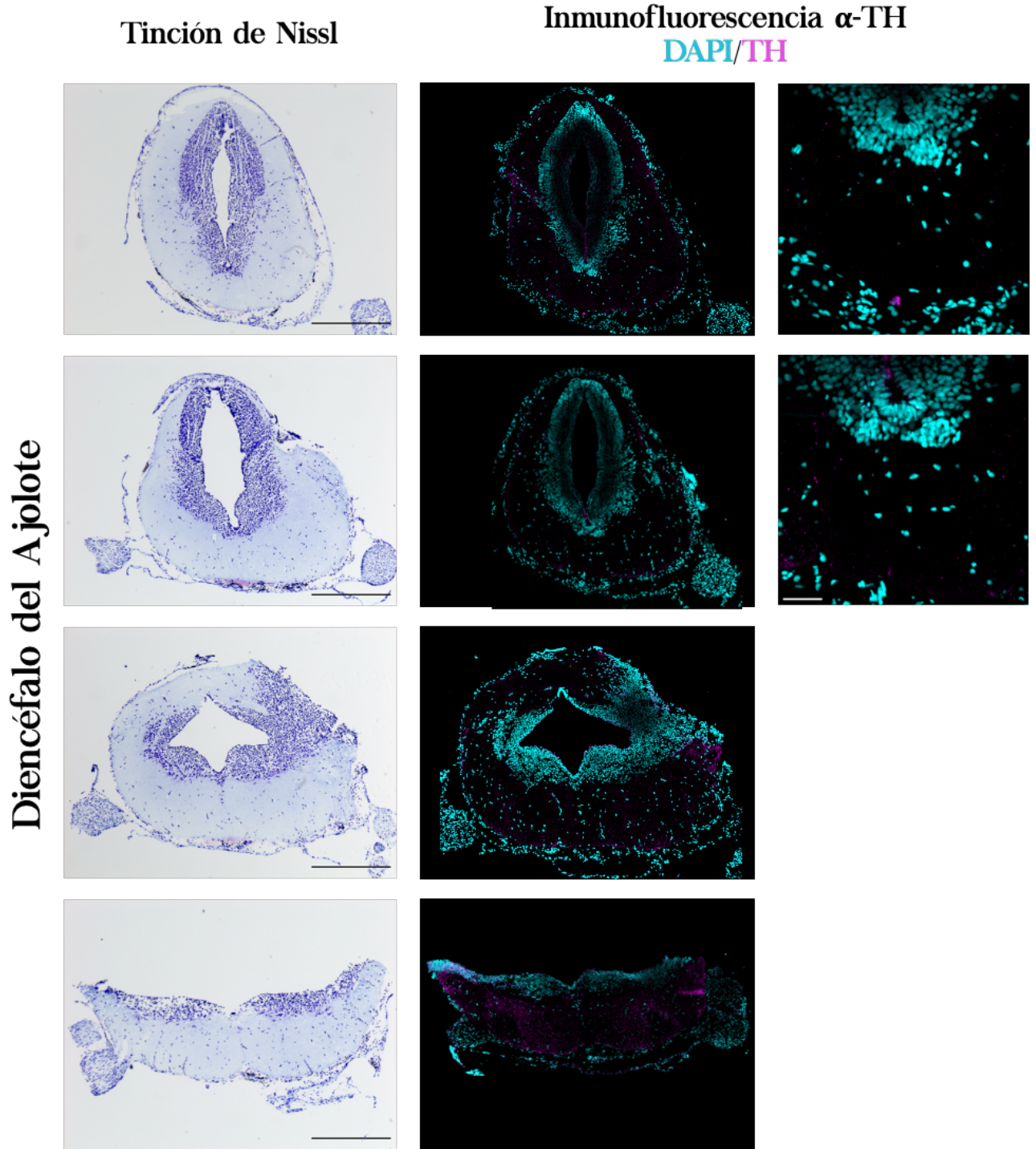
Como una de las zonas con mayor marcaje de TH fue el cerebro medio, se procedió a realizar cortes con tinciones de Nissl para visualizar la distribución de los somas neurales, e inmunofluorescencias para  $\alpha$ -TH. Como resultado se encontró una cantidad considerable de somas TH<sup>+</sup> en la frontera entre el Telencéfalo Caudal y el Diencéfalo. Dicho número de neuronas se encuentran mayormente distribuidas en la zona ventral. Una segunda zona donde se encontraron neuronas TH<sup>+</sup> fue en el Diencéfalo Caudal, justo en la zona donde se fusiona en neuroepitelio para formar el Mesencéfalo (**Figura 10**). Al observar el marcaje  $\alpha$ -TH en el Mesencéfalo, se encontró que las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran en mayor distribución en el Mesencéfalo rostral. Conforme avanza de manera caudal, se reduce el número de neuronas catecolaminérgicas en el Mesencéfalo y hay una reducción de tamaño del tercer ventrículo. También, se pudo observar neuronas TH<sup>+</sup> en los extremos dorsales del hipotálamo (**Figura 11**). Por último, al observar el marcaje  $\alpha$ -TH en el Rombencéfalo del ajolote, no se encontró algún soma TH<sup>+</sup>, sin embargo, se pudieron observar una gran cantidad de fibras TH<sup>+</sup> (**Figura 12**). Por lo anterior, podemos identificar que las neuronas catecolaminérgicas se encuentran distribuidas preferencialmente en las zonas ventrales del Diencéfalo y Mesencéfalo Anterior, cuyas prolongaciones se encuentran distribuidas en el Diencéfalo, Mesencéfalo y Rombencéfalo. Con este resultado se corrobora que la distribución de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro del ajolote se encuentra conservada con otros vertebrados; y al mismo tiempo, se ayuda a establecer que las zonas del cerebro medio ventral como las zonas óptimas a evaluar tras la inyección de la neurotoxina que permita la eliminación selectiva de estas neuronas.



**Figura 10.** Las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran distribuidas a lo largo del Diencefalo Ventral del Ajolote. Se muestran tinciones de Nissl, e Inmunofluorescencias  $\alpha$ -TH en diferentes cortes, en orden progresivo al eje rostro-caudal desde el Diencefalo, hasta la frontera Diencefalo/Mesencefalo. Barra de escala: 100 $\mu$ m.



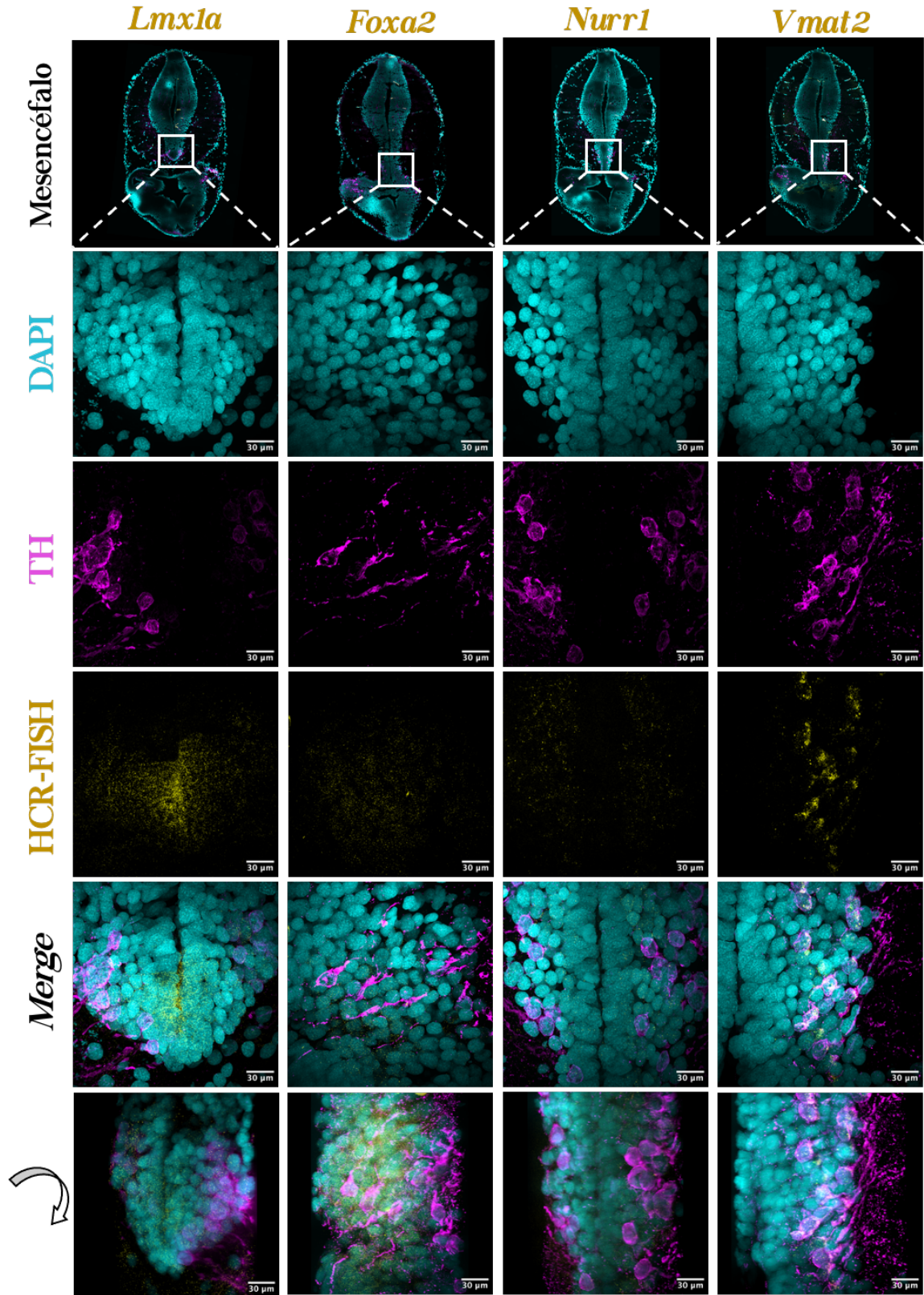
**Figura 11. Las neuronas TH+ se encuentran distribuidas a lo largo del Mesencéfalo Anterior del ajolote.** Se muestran tinciones de Nissl, e inmunofluorescencias para  $\alpha$ -TH en diferentes cortes, en orden progresivo al eje rostro-caudal del Mesencéfalo. Barra de escala: 100 $\mu$ m.



**Figura 12.** No se detectaron neuronas TH<sup>+</sup> a lo largo del Mesencéfalo Posterior ni Rombencéfalo. Se muestran tinciones de Nissl, e inmunofluorescencias para  $\alpha$ -TH en diferentes cortes, en orden progresivo al eje rostro-caudal del Mesencéfalo y Rombencéfalo. Barra de escala: 100 $\mu$ m.

### 3. Las neuronas TH<sup>+</sup> del mesencéfalo ventral comparten otros marcadores dopaminérgicos como *Nurr1*<sup>+</sup> y *Vmat2*<sup>+</sup>

Se ha caracterizado que las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo de los ratones adultos mantienen la expresión de genes involucrados en la diferenciación a dicho linaje durante el desarrollo embrionario, permitiendo tener una combinación de factores de transcripción que permitan identificar la identidad dopaminérgica con certeza. Para caracterizar si las neuronas dopaminérgicas del ajolote comparten la misma expresión de genes asociados de las neuronas TH<sup>+</sup> del mesencéfalo del ratón, se realizaron HCR-FISH para identificar los transcritos de *Foxa2*, *Lmx1a*, *Nurr1* y *Vmat2*, acoplado a la inmunofluorescencia para  $\alpha$ -TH. Como resultado se encontró que la expresión de *Foxa2*, y *Lmx1a* se encuentra en todas las células del mesencéfalo ventral, incluyendo las TH<sup>+</sup>, con una mayor expresión en la zona de los progenitores gliales. En cambio, la expresión de *Nurr1* se encuentra a partir de la tercera capa del neuroepitelio del mesencéfalo ventral, siendo negativa su expresión a la zona de los progenitores gliales. Por último, se encontró que la expresión de *Vmat2* está exclusivamente restringida a las neuronas TH<sup>+</sup>, indicando el uso de la expresión de este gen como otro marcador específico de las neuronas TH<sup>+</sup> en el mesencéfalo del ajolote (**Figura 13**). Estos resultados indican que la identidad dopaminérgica entre los ratones y ajolotes puedan ser diferente. Al mismo tiempo, permite tener un entendimiento espacial de la diferenciación neuronal ya que la expresión de los genes más tempranos se encuentra en la VZ, y los más tardíos en las capas superiores del neuroepitelio.



**Figura 13.** Las neuronas TH<sup>+</sup> del Mesencéfalo son *Nurr1*<sup>+</sup> y *Vmat2*<sup>+</sup>. Se muestran las HCR-FISH de *Lmx1a*, *Foxa2*, *Nurr1*, y *Vmat2* en acoplamiento con Inmunofluorescencia para α-TH en el mesencéfalo del ajolote. La última fila representa una reconstrucción 3D del merge para poder visualizar las fibras de las neuronas TH<sup>+</sup>.

#### **4. La concentración óptima de 6-OHDA para la eliminación de las Neuronas TH<sup>+</sup> es 6 µg/µl**

Para eliminar a las neuronas catecolaminérgicas de forma selectiva, se realizaron inyecciones intraventriculares al nivel del tercer ventrículo de 6-Hidroxidopamina (**6-OHDA**). Se usaron 3 concentraciones de 6-OHDA: 4µg/µl, 6µg/µl, y 8µg/µl, y se evaluó el marcaje para α-TH en el Mesencéfalo rostral a las 48 horas post-inyección (**hpi**). Como control se utilizó la inyección intraventricular con el Vehículo de la 6-OHDA (Ácido Ascórbico 0.2 mg/ml disuelto en Solución Salina [NaCl 0.9%]). Como resultado se encontró que con la concentración de 4µg/µl no se eliminan por completo las neuronas ya que aún se observan fibras positivas, pero ningún soma TH<sup>+</sup>, lo cual indica que el tratamiento está induciendo la muerte neuronal con menor velocidad. Por otro lado, con las inyecciones de 6-OHDA 6 µg/µL y 8 µg/µl se eliminaron por completo las neuronas TH<sup>+</sup> (**Figura 14**). Dado que la condición de 6-OHDA 6 µg/µl es la menor concentración que induce la muerte neuronal a las 48 hpi fue seleccionada como la concentración óptima para los futuros estudios.

#### **5. Las Neuronas TH<sup>+</sup> son eliminadas a las 24 horas post inyección de 6-OHDA**

Para estudiar los procesos de diferenciación durante la regeneración de las neuronas TH<sup>+</sup>, se tuvo que definir el tiempo exacto en el cual se eliminan las neuronas catecolaminérgicas. Para esto, se realizaron inyecciones intraventriculares con 6-OHDA 6 µg/µl y se obtuvieron los cerebros a las 6, 12, 24, 36 y 48 horas post-inyección (**hpi**). Al realizar el inmunomarcaje para α-TH, se observó que a las 6 hpi aún se observan neuronas TH<sup>+</sup> en el mesencéfalo rostral. Sin embargo, a las 12 hpi el número de somas TH<sup>+</sup> disminuyen, siendo las 24 hpi el tiempo donde no se visualiza ningún soma TH<sup>+</sup>, pero sí fibras con marcaje positivo. A las 48 hpi se observa la eliminación completa de las neuronas TH<sup>+</sup> ya que no se visualizan somas ni proyecciones citoplasmáticas positivas (**Figura 15**). Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de 6-OHDA requiere aproximadamente 12 h en señalar desde las terminales sinápticas hasta el núcleo celular para la activación de los procesos de muerte celular.



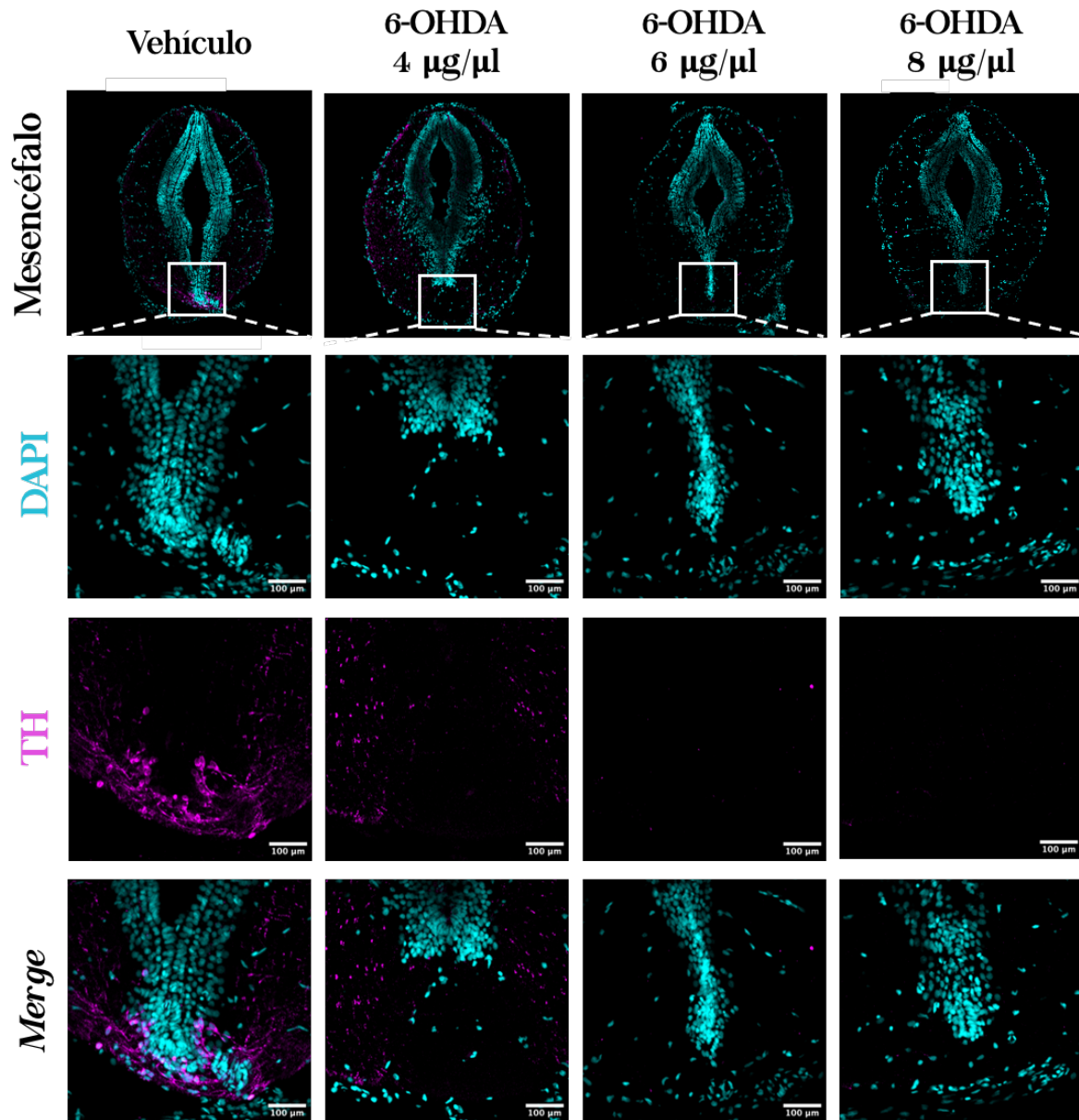


Figura 14. La inyección con 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de 6-OHDA es la óptima para eliminar a las neuronas catecolaminérgicas. Se muestran inmunofluorescencias para  $\alpha$ -TH representativas del Mesencéfalo anterior con diferentes tratamientos de 6-OHDA a las 48 horas post-tratamiento. Como control se realizó la inyección intraventricular con el vehículo (Ácido Ascórbico 0.2mg/ml), N=3.

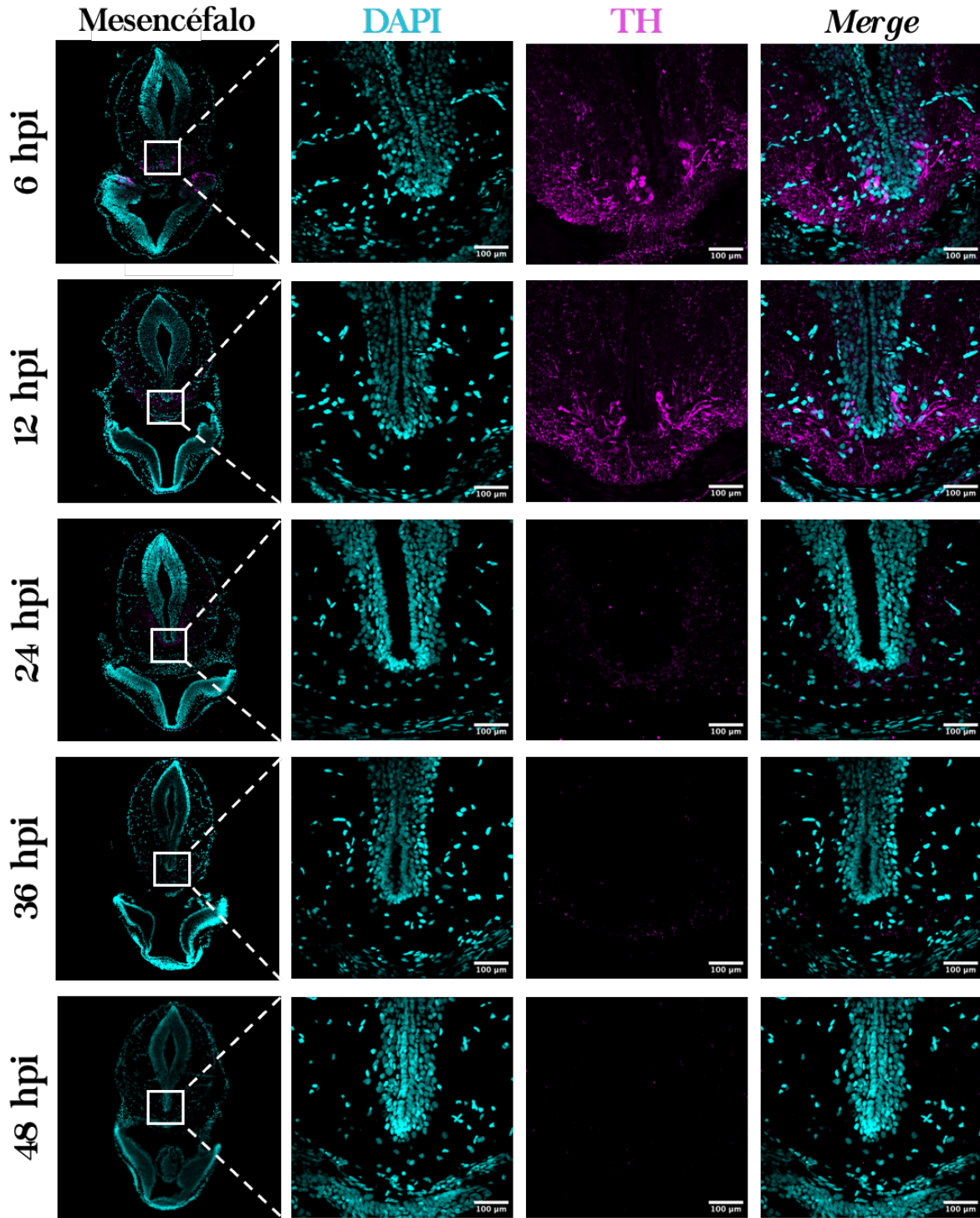
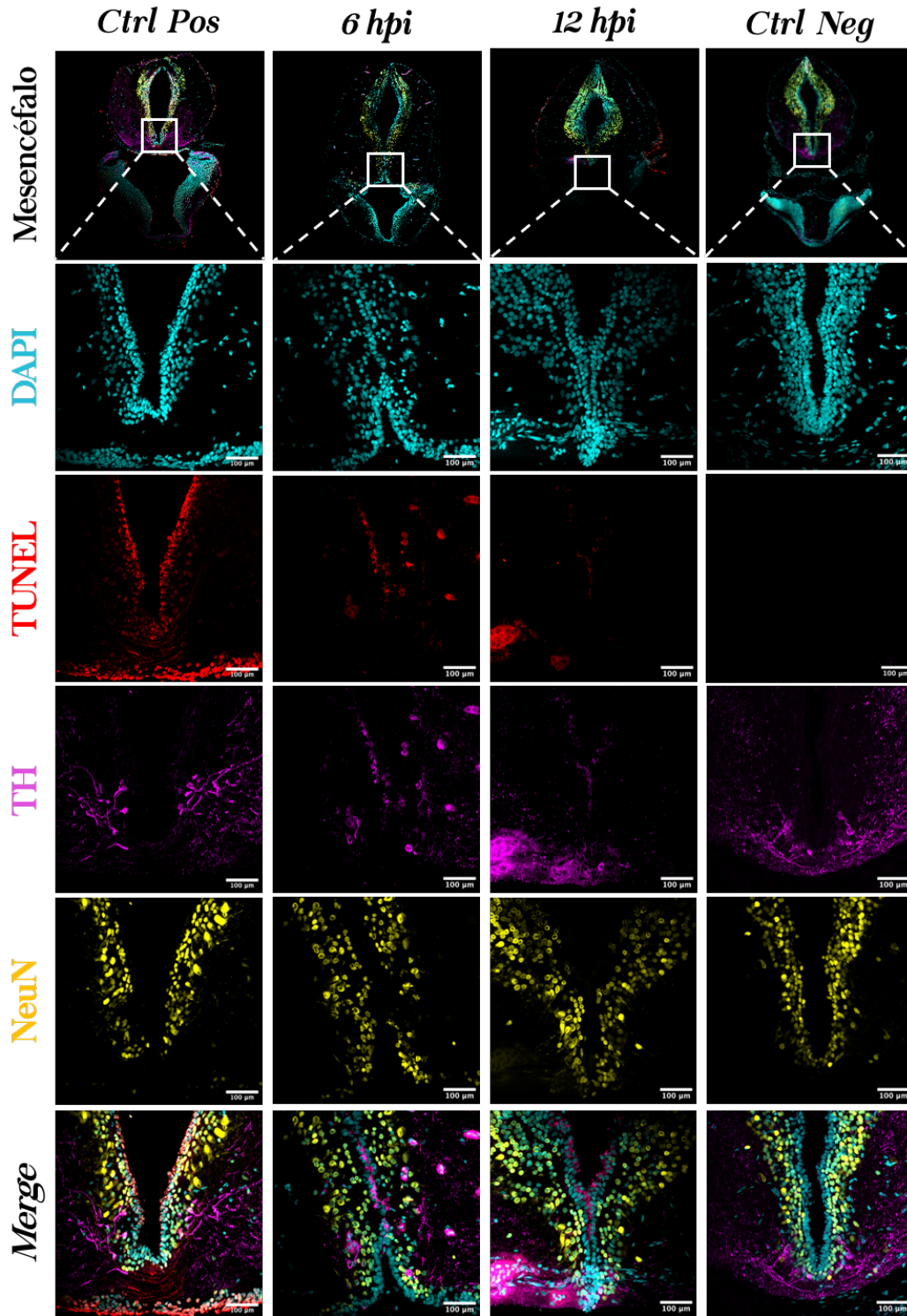


Figura 15. Las neuronas catecolaminérgicas son eliminadas a las 24 horas posteriores a la inyección intraventricular con 6-OHDA. Se muestran inmunofluorescencias para  $\alpha$ -TH representativas del Mesencéfalo anterior a diferentes tiempos tras la inyección intraventricular de 6  $\mu$ g/ $\mu$ l de 6-OHDA, N=5.

## **6. La muerte neuronal asociada a la inyección con 6-OHDA es por vía apoptótica**

Para confirmar la muerte celular observada por la falta de inmunomarcaje de TH tras la inyección intraventricular de 6-OHDA a las 24 hpi, se realizaron pruebas de TUNEL acopladas a inmunofluorescencias para  $\alpha$ -TH a las 6 y 12 hpi. Como resultado, se encontró que la señal de TUNEL sólo se encuentra en las células TH<sup>+</sup> a las 6 hpi, y que ésta disminuye a las 12 hpi (**Figura 16**). Para determinar que el marcate de TUNEL observado es exclusivo de las neuronas TH<sup>+</sup> y no de otro tipo neuronal, al mismo tiempo se realizó la inmunofluorescencia para detectar el antígeno nuclear neuronal NeuN, que sirve como marcador general de neuronas. Como resultado no se encontró ningún marcate TUNEL<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>/TH<sup>-</sup>. Como control positivo de la técnica se utilizó un corte de mesencéfalo del ajolote en condiciones control tratado con DNAsa RQ-1 que promueve la degradación del DNA para posteriormente ser detectado por la técnica TUNEL. Por el contrario, se utilizó como control negativo un corte de mesencéfalo en condiciones control sin la adición de la enzima Desoxinucleotidil transferasa Terminal (**TdT**, por sus siglas en inglés). Estos resultados indican que el rompimiento del DNA, evento que precede a diversos tipos de muerte celular, ocurre específicamente en las neuronas TH<sup>+</sup> tras seis horas de la inyección intraventricular con 6-OHDA. Esto da pauta a hipotetizar la temporalidad en la que se activan las vías de señalización y la inducción de la muerte neuronal



**Figura 16.** La muerte neuronal asociada a la inyección de 6-OHDA es por vía apoptótica. Se muestran ensayos de TUNEL acopladas a inmunofluorescencias  $\alpha$ -TH representativas del Mesencéfalo a las 6 y 12 hpi de 6-OHDA. Como control positivo se utilizó un tejido tratado con DNAsa RQ1, y como control negativo un tejido sin la adición de la enzima TdT. N=2.

## 7. Los progenitores neurales proliferan a las 24 hpi de 6-OHDA

Como uno de los primeros eventos celulares reportados tras lesiones del CNS en animales regenerantes es la proliferación de los progenitores neurales, se realizaron inmunofluorescencias dobles para  $\alpha$ -GFAP (marcador de progenitores gliales), y  $\alpha$ -Antígeno Nuclear de Células en Proliferación (PCNA, por sus siglas en inglés). Como resultado se encontró que los progenitores GFAP positivos empiezan los procesos de duplicación del DNA (y probablemente mitosis) a las 24 hpi de 6-OHDA, tiempo donde las neuronas TH<sup>+</sup> son eliminadas (**Figura 17**). De manera interesante, la marca PCNA<sup>+</sup> incrementa conforme al tiempo, siendo las 48 hpi el punto donde se detectó mayor proliferación celular. En este último tiempo el marcaje PCNA positivo no sólo se observó a nivel de los progenitores neurales; sino en neuronas diferenciadas. Estos resultados sugieren que 1) dichas células podrían ser células de amplificación transitoria, o 2) las neuronas diferenciadas preexistentes participan en la regeneración con eventos de desdiferenciación o transdiferenciación.

## 8. La regeneración de las neuronas TH<sup>+</sup> se observa a los 10 días post inyección de 6-OHDA

Para estudiar el tiempo en que reaparecen las neuronas TH<sup>+</sup> tras la inyección de 6-OHDA, se evaluó la marca  $\alpha$ -TH en el mesencéfalo del ajolote a los 2, 5, 10 y 20 días post-inyección (dpi). Como resultado se confirmó la ausencia del marcaje de TH a los 2 dpi, y que se mantiene a los 5 dpi. Sin embargo, a los 10 dpi el marcaje de TH reaparece, siendo los 20 dpi donde el marcaje es mayor (**Figura 18**). Este último resultado indica una temporalidad en la regeneración y *per se* que la diferenciación de las ERGs hacia el linaje dopaminérgico está sucediendo en una ventana de tiempo a por lo menos 10 días posteriores a la inyección de la 6-OHDA.

## 9. Las neuronas dopaminérgicas regeneradas a los 20 dpi son NeuN<sup>+</sup>

Para poder definir si a los 20 dpi las neuronas marcadas con TH estaban diferenciadas se realizó una doble IF  $\alpha$ -TH/ $\alpha$ -NeuN encontrando que la mayoría de las neuronas TH<sup>+</sup> son NeuN<sup>+</sup> (Figura 19). Este resultado sugiere que la diferenciación hacia linaje dopaminérgico se completa a los 20 dpi al tener marcadores de neuronas maduras coexpresadas con TH.

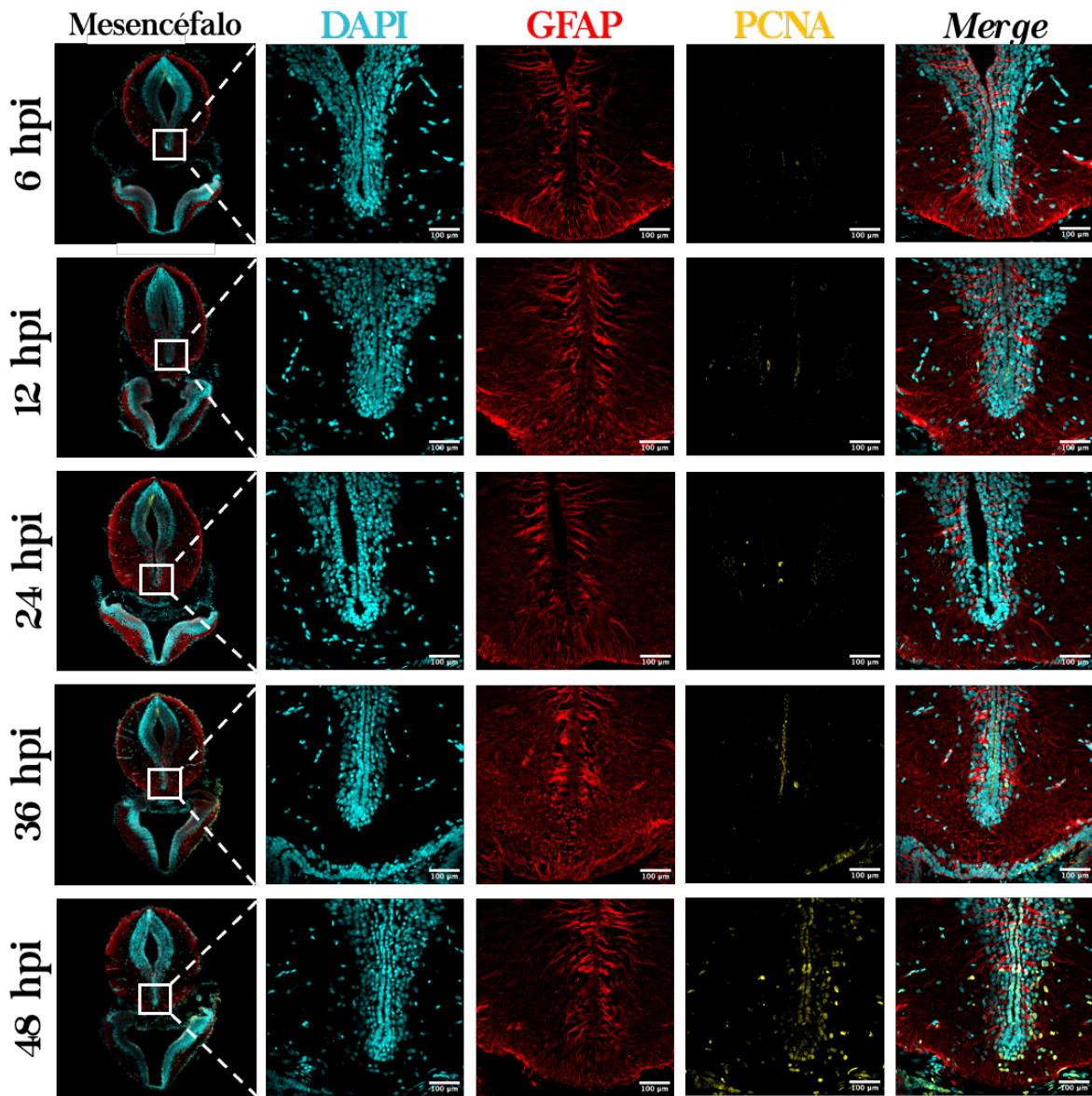


Figura 17. Los progenitores neurales proliferan a las 24 hpi de 6-OHDA. Se muestran dobles inmunofluorescencias  $\alpha$ -GFAP/ $\alpha$ -PCNA representativas del Mesencéfalo a las 6, 12, 24, 36 y 48 hpi de 6-OHDA. N=4.

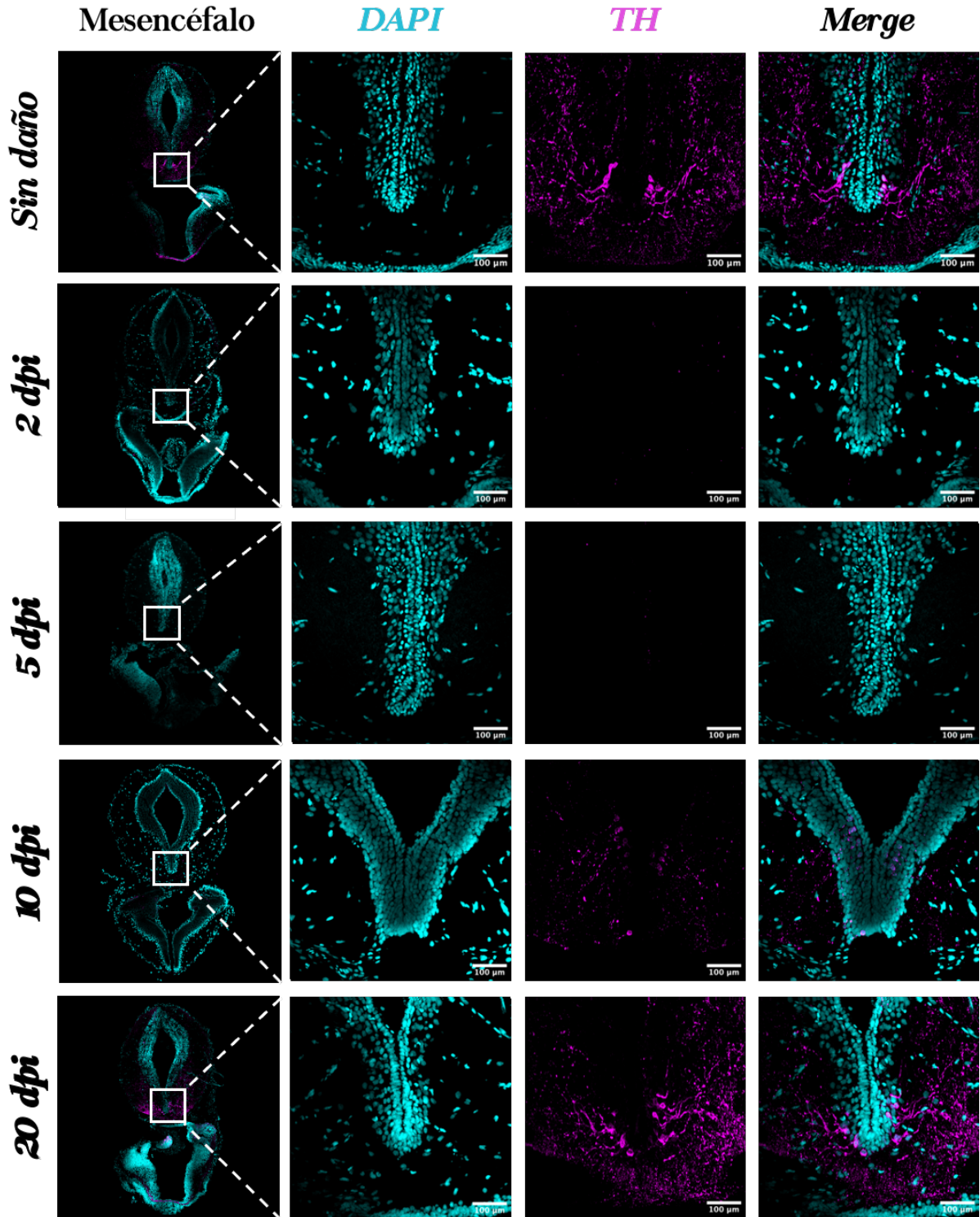
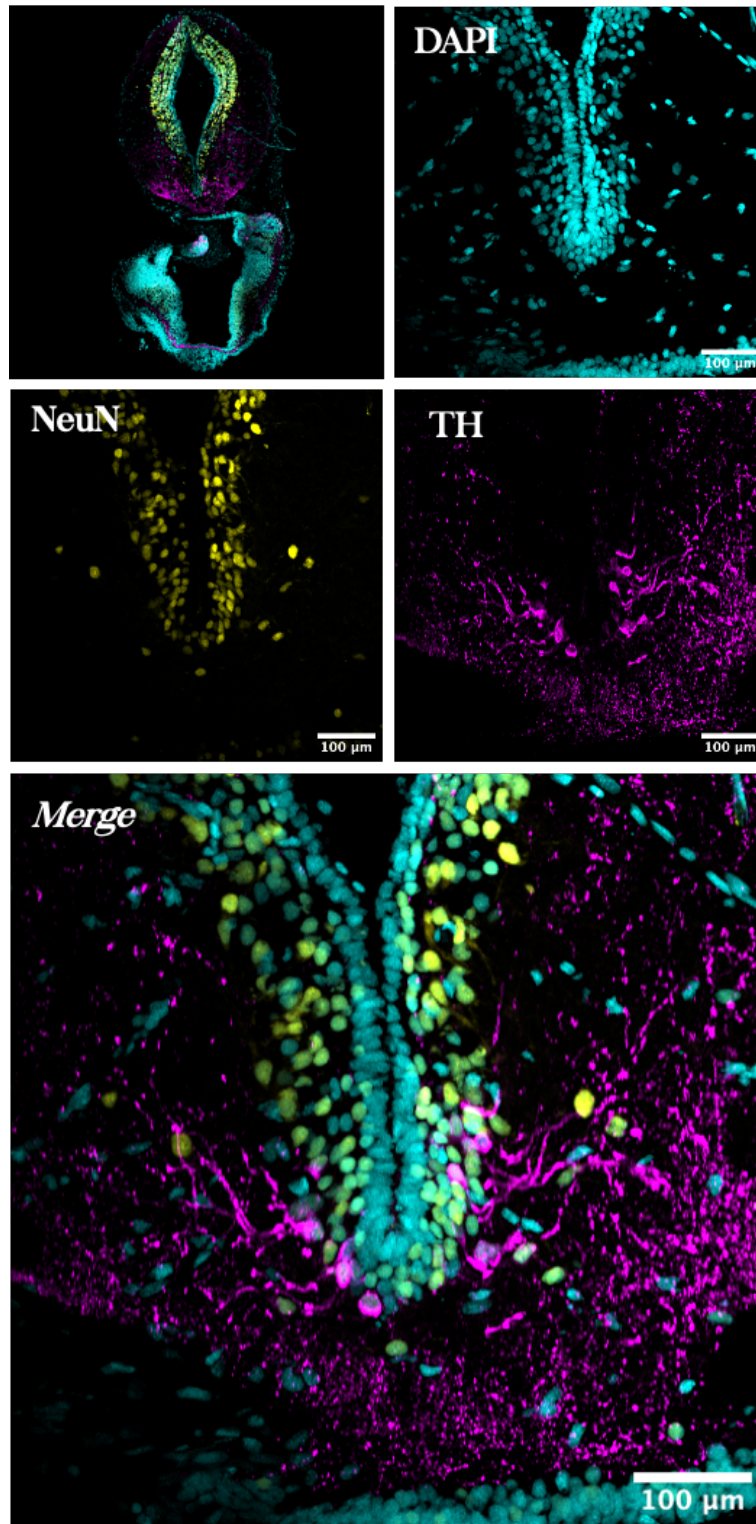


Figura 18. La regeneración de las neuronas TH+ se observa desde los 10 días post-inyección de la 6-OHDA. Se muestran imágenes representativas de las Inmunofluorescencias para  $\alpha$ -TH del Mesencéfalo a 2, 5, 10 y 20 dpi de la 6-OHDA. N=4.

20 dpi



**Figura 19.** Las neuronas dopaminérgicas regeneradas a los 20 dpi son NeuN<sup>+</sup>. Se muestran imágenes representativas de las Inmunofluorescencias  $\alpha$ -TH/ $\alpha$ -NeuN del Mesencéfalo a 20 dpi de la 6-OHDA. N=4.



## 10. Durante la regeneración de las neuronas TH<sup>+</sup> se sobreexpresan genes asociados a diferenciación dopaminérgica

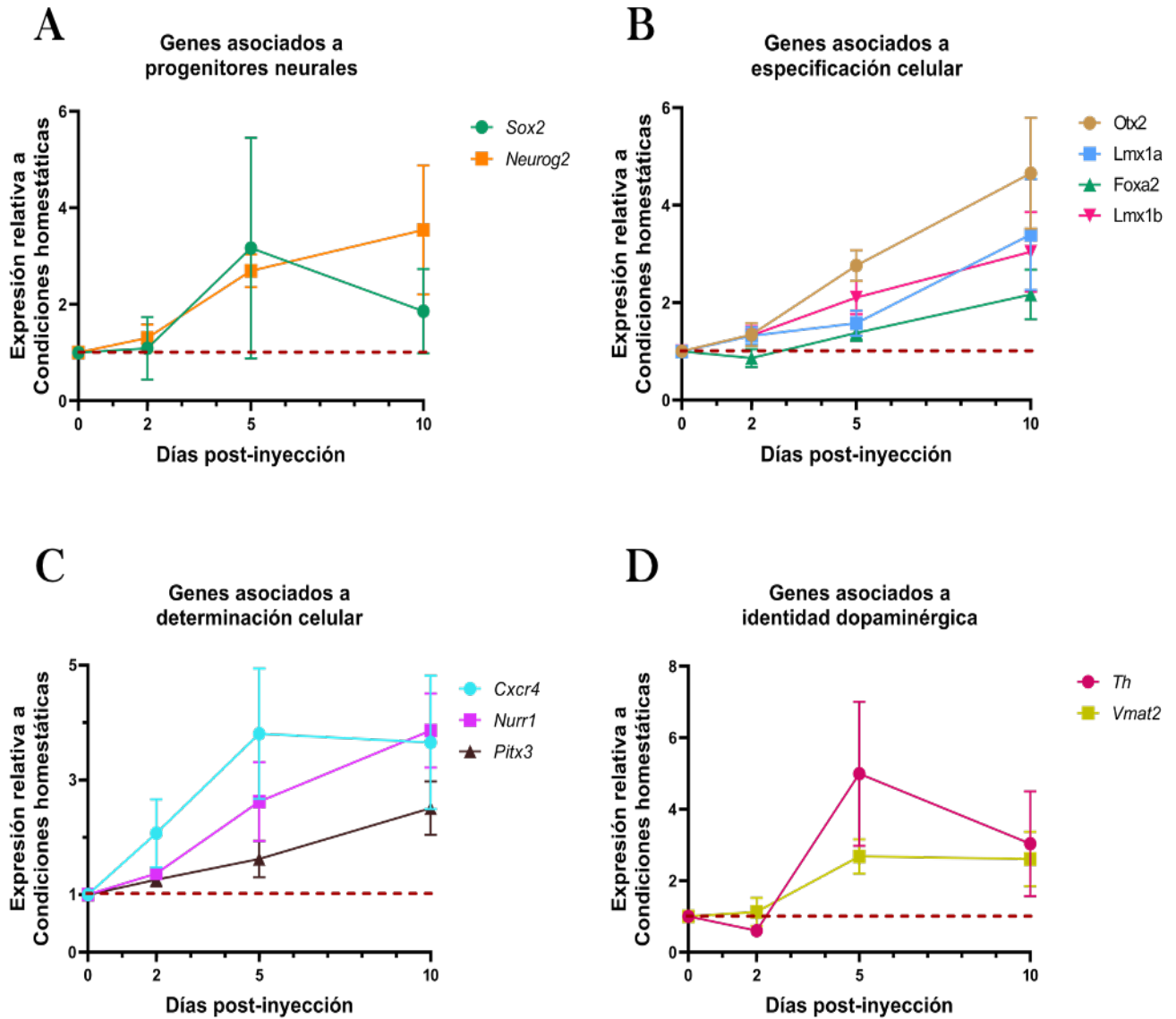
Dado que las primeras neuronas TH<sup>+</sup> son detectadas a los 10 dpi, lo que indica un proceso de diferenciación de las ERGs a por lo menos en este tiempo, se evaluó la expresión de genes asociados a diferenciación dopaminérgica a los 2, 5 y 10 dpi de 6-OHDA. Se evaluaron genes asociados a progenitores neurales como *Sox2*, y *Ngn2*; genes asociados a la especificación de progenitores como *Otx2*, *Lmx1a*, *Lmx1b* y *Foxa2*; de determinación celular como *Cxcr4*, *Nurr1*, y *Pitx3*; y genes asociados a identidad dopaminérgica como *Th*, y *Vmat2*. En todas las condiciones se utilizó el gen Housekeeping *Rpl13* y se normalizaron las condiciones con el mesencéfalo en condiciones homeostáticas (0 dpi).

Para evaluar todas las secuencias de los oligonucleótidos diseñados, se realizó una RT-qPCR con RNA control proveniente de diferentes tejidos de ajolote adulto y embrionario. Así, se comprobó que todos los pares de oligos funcionaron ya que amplificaron y se obtuvieron los amplicones correspondientes al diseño *in silico* (**Anexo VI**). Una vez comprobada la funcionalidad de los oligos, se estudió la expresión de los genes en mesencéfalos inyectados con 6-OHDA a diferentes tiempos de regeneración. Se evaluaron con 3 experimentos independientes y se normalizó la expresión basal de todos los genes con el gen Housekeeping; y a su vez se hizo una segunda normalización con la expresión de los genes en el mesencéfalo de ajolote en condiciones hemostáticas. De esta forma se obtuvo el Delta-Delta CT.

Como resultado, se encontró una tendencia de expresión al alta de todos los genes conforme la regeneración progresaba en el tiempo. Específicamente, la expresión de los genes asociados a progenitores neurales como *Sox2* y *Neurogenina-2* tuvieron una expresión al alta desde los 2 dpi la cual fue creciendo y fue sostenida a lo largo de los 10 dpi (**Figura 19-A**). En cuanto a la expresión de los genes asociados a especificación celular se encontró que *Otx2*, *Lmx1a*, *Foxa1* y *Lmx1b* tuvieron una sobreexpresión hasta los 5 dpi la cual siguió aumentando a los 10 dpi (**Figura 20-B**).

Los genes asociados a determinación celular presentaron una tendencia más alta de expresión a tiempos más cortos: *Cxcr4*, *Nurr1* y *Pitx3* mostraron una expresión al alta desde los 2 dpi, teniendo su pico máximo a los 5 dpi y sosteniéndose a los 10 dpi (**Figura 20-C**).

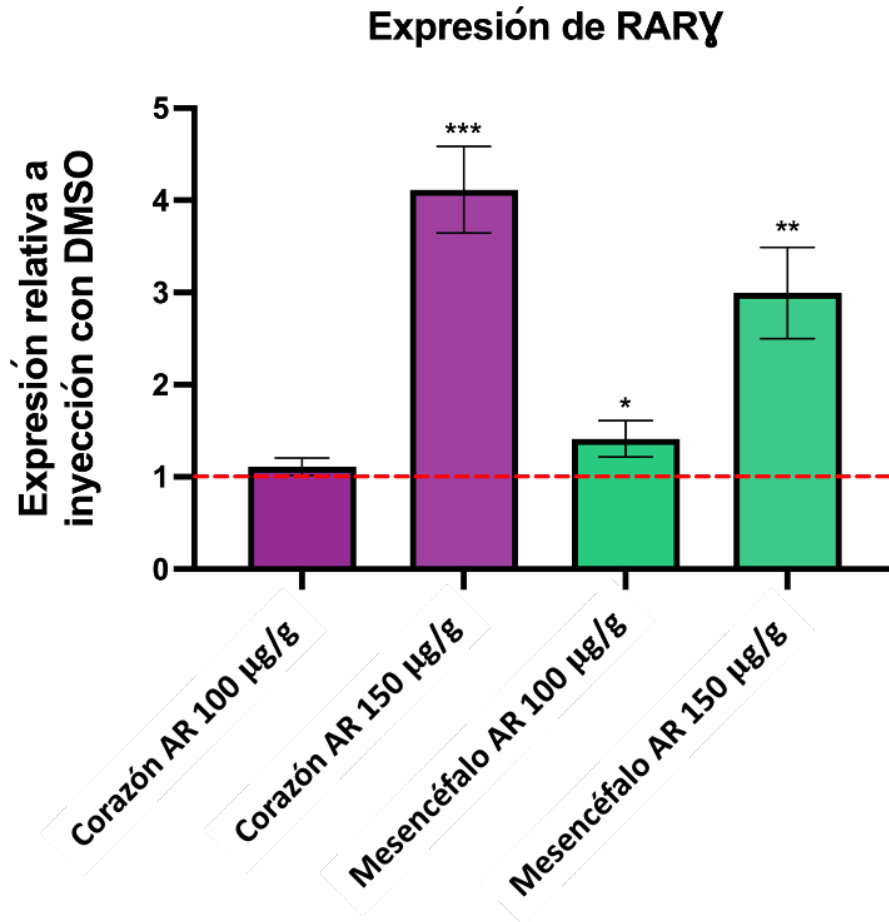
En cuanto a los genes asociados a diferenciación dopaminérgica se encontró que *Th* tuvo una expresión disminuida a los 2 dpi lo cual indica la eliminación de estas células; y su expresión incrementa drásticamente a los 10 dpi. De manera contraria *Vmat2* tuvo una expresión al alta al tener hasta los 5 dpi que se mantiene a los 10 dpi (**Figura 20-D**). Estos resultados indican una dinámica de expresión de los genes asociados a la diferenciación hacia el linaje dopaminérgico de una manera similar a lo que ocurre durante el desarrollo embrionario, pero en una temporalidad de 10 dpi, justo cuando se observa la regeneración de las neuronas TH<sup>+</sup>.



**Figura 20. Durante la regeneración de las neuronas TH<sup>+</sup> se sobreexpresan genes asociados a la diferenciación dopaminérgica** RT-qPCRs de 3 experimentos independientes. Se evaluó la expresión de varios genes asociados a la diferenciación dopaminérgica a los 2, 5 y 10 dpi de 6-OHDA. Se muestran los Promedios  $\pm$  SEM. (\*) =  $p < 0.05$ ; y (\*\*\*) =  $p < 0.0001$ . Se muestra una línea roja en “1” indicando la normalización de los valores con respecto a la expresión en condiciones homeostáticas del mesencéfalo (antes de la lesión) de los genes asociados a progenitores neurales (A), de genes asociados a especificación celular (B), a determinación celular (C), y de identidad dopaminérgica (D).

## 11. Inyecciones intraperitoneales de Ácido Retinoico aumenta la expresión del gen *RARγ* en el cerebro del ajolote.

Para evaluar los efectos sobre la regeneración de las neuronas dopaminérgicas al modular la vía de señalización del ácido retinoico primero se evaluó si la inyección intraperitoneal de RA aumenta la expresión del gen blanco *RARγ* en el mesencéfalo. Se inyectó una solución de RA 100 o 150  $\mu\text{g/g}$  de masa de ajolote diluido en DMSO, y 24 horas después se sacrificó al ajolote para evaluar la expresión de *RARγ* mediante RT-qPCR en el mesencéfalo. Como control positivo se extrajo y se midió la expresión de *RARγ* en el corazón, tejido donde se ha demostrado su competencia a la actividad del AR (Drowley et al., 2020; Xavier-Neto et al., 2015) ; además es un tejido que estaría directamente en contacto con la solución inyectada de manera intraperitoneal. Como resultado, se encontró una ligera sobreexpresión de *RARγ* en el mesencéfalo tras la inyección de 100  $\mu\text{g/g}$  de RA, mientras que el corazón no tuvo cambios (Corazón 100  $\mu\text{g/g}$  DE AR:  $1.11 \pm 0.094$ ; Mesencéfalo 100  $\mu\text{g/g}$  de RA:  $1.414 \pm 0.197$ ). Por otro lado, la inyección de 150  $\mu\text{g/g}$  de RA resultó en una sobreexpresión notoria tanto en el corazón como en el mesencéfalo del ajolote (corazón 150  $\mu\text{g/g}$  de RA:  $4.115 \pm 0.469$ ; Mesencéfalo 150  $\mu\text{g/g}$  de RA:  $2.995 \pm 0.496$ ) (**Figura 21**). Estos resultados demuestran que la inyección intraperitoneal de AR en una concentración de 150  $\mu\text{g/g}$  es suficiente para activar esta vía de señalización en el mesencéfalo del ajolote, y por lo tanto es la concentración para utilizar en futuros experimentos.



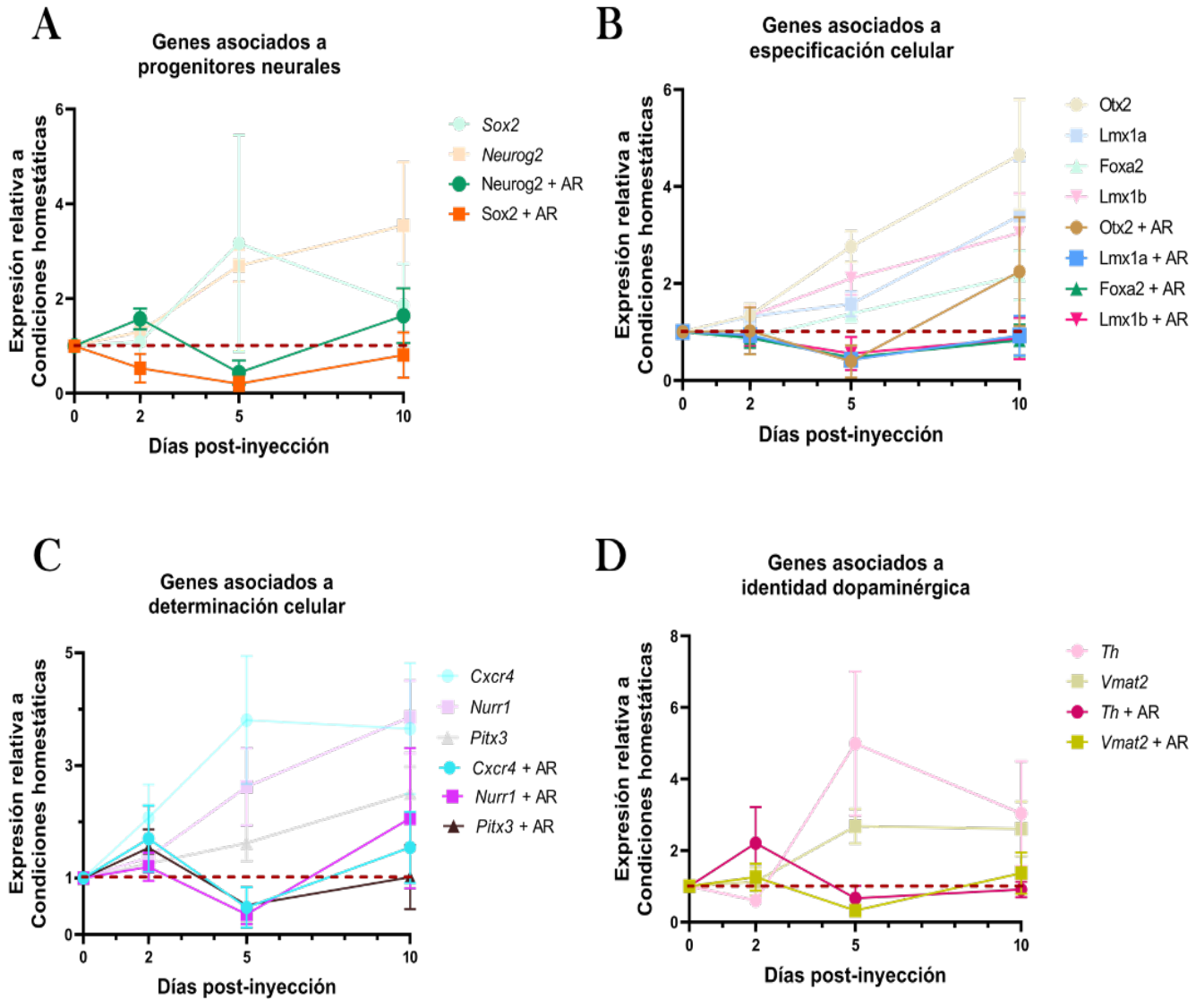
**Figura 21.** La inyección intraperitoneal de RA aumenta la expresión del gen *RAR $\gamma$*  en el cerebro del ajolote. RT-qPCRs de 3 experimentos independientes. Se evaluó la expresión de *RAR $\gamma$*  tras las 24 horas de inyección intraperitoneal de ácido retinoico en el corazón (control positivo de expresión) y el mensencéfalo. Se muestran los promedios  $\pm$  SEM y los resultados de la prueba estadística T de Student con (\*) =  $p < 0.05$ ; (\*\*) =  $p < 0.01$ , y (\*\*\*) =  $p < 0.0001$ . Se muestra una línea roja en “1” indicando la normalización de los valores con respecto a la inyección intraperitoneal con DMSO.

## 12. El aumento en los niveles de Ácido Retinoico retrasa el proceso de diferenciación hacia linaje dopaminérgico

Para evaluar los efectos sobre la regeneración de las neuronas dopaminérgicas al modular la vía de señalización del ácido retinoico se inyectó intraperitonealmente una solución de 150  $\mu\text{g/g}$  de masa del ajolote de RA a las 24 hpi de 6-OHDA. Posteriormente se evaluó la expresión de genes asociados a la diferenciación dopaminérgica a los 2, 5 y 10 dpi de 6-OHDA.

Como resultado se encontró una sobreexpresión del gen asociado a progenitores neurales *Neurog2* a los 2 dpi, que descendió en uno de los tiempos evaluados (expresión de  $1.572 \pm 0.2817$  a los 2 dpi;  $0.434 \pm 0.255$  a los 5 dpi; y de  $1.640 \pm 0.579$  a los 10 dpi.). Al contrario, en todos los demás genes asociados a progenitores neurales y tiempos evaluados se encontró una expresión a la baja: *Sox2* a los 2 dpi tuvo un promedio de  $0.531 \pm 0.306$  veces menos que en condiciones homeostáticas; a los 5 dpi  $0.201 \pm 0.149$ ; y a los 10 dpi  $0.806 \pm 0.477$ . (**Figura 22-A**). Por otra parte, en los genes asociados a especificación celular como *Otx2* se observó una media de expresión de  $1.021 \pm 0.485$  veces que en condiciones homeostáticas a los 2 dpi;  $0.392 \pm 0.333$  a los 5 dpi; y  $0.828 \pm 1.126$  a los 10 dpi. *Lmx1a* tuvo una media de expresión de  $0.937 \pm 0.066$  a los 2 dpi;  $0.425 \pm 0.024$  a los 5 dpi; y  $0.923 \pm 0.412$  a los 10 dpi. De manera similar *Foxa2* presentó una expresión de  $0.873 \pm 0.198$  veces a los 2 dpi;  $0.476 \pm 0.124$  a los 5 dpi; y  $0.828 \pm 0.328$  a los 10 dpi, mientras que *Lmx1b* tuvo una expresión de  $0.887 \pm 0.186$  a los 2 dpi;  $0.553 \pm 0.339$  a los 5 dpi; y  $0.866 \pm 0.428$  a los 10 dpi (**Figura 22-B**).

La expresión de genes asociados a la determinación celular e identidad dopaminérgica presentaron una tendencia al alta en tiempos más cortos (2 dpi) que fue abruptamente perdida a los 5 dpi, y se recuperó gradualmente a los 10 dpi: *Cxcr4* tuvo una expresión de  $1.702 \pm 0.590$  veces más que en condiciones hemostáticas a los 2 dpi; y disminuye a  $0.482 \pm 0.359$  veces menos a los 5 dpi; y  $1.546 \pm 0.631$  a los 10 dpi. *Nurr1* presentó una expresión de  $1.199 \pm 0.249$  veces más a los 2 dpi;  $0.358 \pm 0.174$  a los 5 dpi; y  $2.061 \pm 1.249$  a los 10 dpi. Y *Pitx3*  $1.539 \pm 0.327$  a los 2 dpi;  $0.519 \pm 0.051$  a los 5 dpi; y  $1.019 \pm 0.566$  a los 10 dpi (**Figura 22-C**). En cuanto a los genes asociados a diferenciación dopaminérgica se encontró que *Th* tuvo una expresión aumentada de  $2.204 \pm 1.010$  veces más que en condiciones homeostáticas a los 2 dpi; e disminuye drásticamente a  $0.662 \pm 0.351$  a los 5 dpi; y  $0.909 \pm 0.219$  a los 10 dpi. De manera contraria *Vmat2* disminuyó su expresión al tener  $0.260 \pm 0.337$  veces a los 2 dpi;  $0.320 \pm 0.137$  a los 5 dpi; y  $1.368 \pm 0.578$  a los 10 dpi (**Figura 22-D**).



**Figura 22. El aumento de los niveles de ácido retinoico inhibe la expresión de los genes asociados a diferenciación dopaminérgica.** RT-qPCRs de 3 experimentos independientes. Se evaluó la expresión de varios genes asociados a la diferenciación dopaminérgica a los 2, 5 y 10 dpi de 6-OHDA. Se muestra una línea roja en “1” indicando la normalización de los valores con respecto a la expresión en condiciones homeostáticas del mesencéfalo (antes de la lesión) de los genes asociados a progenitores neurales (A), de genes asociados a especificación celular (B), a determinación celular (C), y de identidad dopaminérgica (D).

Estos resultados indican una dinámica de expresión, en la que los genes asociados a la diferenciación hacia el linaje dopaminérgico se inhiben al aumentar los niveles de ácido retinoico a las 24 hpi de 6-OHDA, sugiriendo que el RA inhibe la diferenciación de las ERGs.

### ***XIII. DISCUSIÓN***

El objetivo general de este proyecto consistió en estudiar la regeneración de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro del ajolote para evaluar los eventos de diferenciación de los progenitores neurales que suceden hacia dicho linaje. Con base en esto como primera parte del proyecto se evaluó la presencia y localización de las neuronas TH<sup>+</sup> en el cerebro completo del ajolote, y se encontró que éstas están distribuidas en mayor proporción en el Diencefalo y Mesencefalo ventral teniendo sus proyecciones hacia las regiones del Bulbo Olfatorio, Telencefalo, Diencefalo, Mesencefalo y Rombencefalo.

Tomando en cuenta la anatomía comparada del diencefalo y mesencefalo del ajolote con otros vertebrados (Lazcano et al., 2021), se concluye que la región donde se encontraron las neuronas TH<sup>+</sup> fue específicamente en el Núcleo Preóptico Posterior, el Hipotálamo Dorsal, el órgano Paraventricular del Diencefalo, el Tegmentum, y el Núcleo Interpeduncular del Mesencefalo. Cabe destacar que las zonas neuroanatómicas del cerebro del ajolote fueron descritas mediante anatomía comparada con otros vertebrados sin incluir estudios funcionales. Por esta razón, queda aún la incógnita si estos núcleos están involucrados en las mismas funciones fisiológicas de las salamandras que típicamente se han estudiado en mamíferos.

El diencefalo es considerado como un centro de transmisión y procesamiento en el cerebro de los vertebrados, conectando el cerebro anterior con el posterior. Los derivados alares (dorsales) de los prosómeros p3, p2 y p1 en las salamandras son el pretálamo, el tálamo y el pretegmentum, respectivamente (Joven, Morona, González, et al., 2013a, 2013b; Joven, Morona, Moreno, et al., 2013; Morona & González, 2008). El pretálamo recibe señales de la retina y somatosensoriales, y contiene varios núcleos incluyendo una subpoblación dopaminérgica. Se propone que esta población de neuronas dopaminérgicas proyecta al área preóptica, al septum, al palio medial del telencefalo y a los ganglios basales. (A. González et al., 2020; Joven, Morona, González, et al., 2013b; Northcutt & Kicliter, 1980). El complejo habenular es un derivado del techo del prosómero p2, y representa la parte más asimétrica del cerebro de la salamandra, y se propone que es importante para la conducción diencefálica dorsal (Bianco & Wilson, 2009). La habénula recibe señales del cuerpo estriado, el polo posterior del telencefalo, del tálamo, el hipotálamo, el área preóptica, el tegmento y a su vez proyecta hacia el tálamo, el hipotálamo, el área preóptica y el tegmento (Rudolf



Nieuwenhuys, Hendrik Jan Donkelaar, Hans J. ten Donkelaar, 1998). Por otro lado, el mesencéfalo alar contiene al tectum óptico, que es un centro integrador de información visual, octavo-lateral y somatosensorial, todas ellas organizadas topológicamente. Otro derivado del mesencéfalo alar es el torus semicircularis, que se ha propuesto como homólogo al colículo inferior de los mamíferos y se ha planteado que procesa señales auditivas, vibratorias y vestibulares en las salamandras. La parte basal del mesencéfalo de las salamandras, o mesencéfalo ventral, contiene los grupos catecolaminérgicos tegmentales que corresponden a los núcleos dopaminérgicos A9 (Sustancia nigra pars compacta) y A10 (Área Tegmental Ventral) de los mamíferos, y el núcleo oculomotor colinérgico (Finkenstedt et al., 1983; Naujoks-Manteuffel et al., 1991; Naujoks-Manteuffel & Manteuffel, 1988; Rudolf Nieuwenhuys, Hendrik Jan Donkelaar, Hans J. ten Donkelaar, 1998).

Las conexiones que tienen las regiones del diencefalo/mesencéfalo en el cerebro de las salamandras con otras partes del SNC ha sido típicamente estudiado por histología, lo cual imposibilita saber con exactitud el grado de conexión que tiene un núcleo con otro núcleo, así como tampoco permite conocer la participación de las neuronas en la fisiología del organismo. Por lo anterior, estudios donde se integre la información del cerebro completo a través de reconstrucciones tridimensionales ayudaría a tener información más detallada sobre el conectoma de cada uno de los núcleos y sus posibles implicaciones fisiológicas.

Otro resultado de este trabajo es que también se encontraron somas catecolaminérgicos en el Bulbo Olfatorio y algunas zonas del Telencéfalo Anterior. Aunque las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran en mayor proporción en el Diencefalo y Mesencéfalo ventral de los mamíferos, también se han encontrado en los Bulbos Olfatorios (McLean & Shipley, 1988). Por otra parte, las neuronas TH<sup>+</sup> tenían una distribución estocástica sin formar parte de un núcleo neuronal del Telencéfalo. Estas últimas neuronas podrían estar en migración celular hacia regiones del Mesencéfalo o el OB, por lo que realizar el análisis de la expresión de la proteína de migración neuronal DCX en las neuronas TH<sup>+</sup> del Telencéfalo Anterior podría dilucidar si la hipótesis anterior es correcta.

Las células TH<sup>+</sup> en los Bulbos Olfatorios de los mamíferos son interneuronas cuya función radica en el procesamiento de olores y la adaptación del OB a las condiciones del medio ambiente (Pignatelli & Belluzzi, 2010). En ratones adultos, las interneuronas del OB

tienen una regeneración periódica y provienen de la VZ de los Ventrículos Laterales, uno de los 2 centros neurogénicos descritos en los mamíferos, donde progenitores neurales proliferan y migran de manera rostral hacia el OB y se diferencian a interneuronas catecolaminérgicas (Belluzzi et al., 2003). La neurogénesis embrionaria de las neuronas TH<sup>+</sup> en los bulbos olfatorios aún no está muy bien descrita; sin embargo, se propone que las vías de diferenciación de las interneuronas catecolaminérgicas son diferentes a las reportadas con las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral (Monzón-Sandoval et al., 2020). El hecho que se hayan encontrado neuronas catecolaminérgicas en los OBs del ajolote sugiere 2 puntos importantes: 1) que pueden existir mecanismos de neurogénesis embrionaria hacia el linaje dopaminérgico del OB similares a los mamíferos, haciendo al ajolote un excelente modelo de estudio para dilucidar los mecanismos moleculares de estas vías de diferenciación alternas al mesencéfalo ventral; y 2) que estudios en el ajolote pueden ayudar a investigar el hecho que los mamíferos sólo podemos tener una regeneración periódica de las interneuronas TH<sup>+</sup> restringidas al OB, y no la regeneración no periódica de las neuronas catecolaminérgicas del cerebro medio, al investigar las diferencias de neurogénesis en ambos contextos.

Para caracterizar las propiedades transcripcionales de las Neuronas TH<sup>+</sup> del mesencéfalo del ajolote se realizaron HCR-FISH de genes involucrados en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas de mamíferos: *Foxa2*, *Lmx1a*, *Nurr1* y *Vmat2*, acoplado a la Inmunofluorescencia de  $\alpha$ -TH. Esto se realizó ya que dichos genes podrían servir como marcadores de neuronas TH<sup>+</sup>. En mamíferos se ha descrito que la expresión de *Foxa2*, *Lmx1a/b*, *Nurr1* y *Pitx3* se mantiene de manera específica en las neuronas catecolaminérgicas de mesencéfalo de los ratones ya que regulan funciones importantes de las neuronas para su supervivencia. La delección de los genes *Lmx1a/b*, *Foxa2*, *Pitx3*, y *Nurr1* en ratones knock-out condicionales adultos llevan a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo promoviendo la aparición de eventos neurodegenerativos característicos de la enfermedad del Parkinson (Doucet-Beaupré et al., 2016; Kadkhodaei et al., 2009; Laguna et al., 2015; Le et al., 2015). En el presente trabajo se encontró que las neuronas TH<sup>+</sup> sólo coexpresan *Vmat2* de manera específica, mientras que la expresión de los demás genes se encontraba diferencialmente distribuida en todas las neuronas del mesencéfalo ventral contrario a lo que sucede en ratones. Con base en esto, es posible que el silenciamiento o

eliminación de dichos genes en ajolotes adultos no afectará de manera drástica la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, probablemente porque se estaría eliminando otra población diferente a las neuronas TH<sup>+</sup>.

El hecho que no se haya encontrado una expresión de *Foxa2*, *Lmx1a*, y *Nurr1* en las neuronas dopaminérgicas, contrario a lo que pasa en mamíferos, sugiere que las neuronas TH<sup>+</sup> son transcripcionalmente diferentes entre estos dos organismos. En el mismo tenor, dichas diferencias podrían impactar en la naturaleza de las neuronas al poder estar implicadas en funciones fisiológicas totalmente diferentes entre estos dos organismos. Para descubrir con exactitud donde radican las diferencias de estas neuronas entre los dos organismos es necesario realizar estudios transcriptómicos y funcionales en organismos adultos.

Otro punto interesante por resaltar es que los patrones de expresión de los genes evaluados podrían estar indicando el proceso de diferenciación que tienen las ERGs durante la regeneración periódica (condiciones homeostáticas) de las neuronas del mesencéfalo ventral. La expresión de *Lmx1a*, y *Foxa2*, genes muy tempranos en la diferenciación de neuronas del cerebro medio ventral, están fuertemente expresadas en la VZ, y su expresión se disminuye en las capas posteriores. Por otro lado, *Nurr1*, gen de determinación celular, no se encuentra expresado en la VZ, sino en la SVZ y MZ; y *Vmat2* sólo siendo expresado en las neuronas TH<sup>+</sup>. En otras palabras, los progenitores que se encuentran en la VZ migran a capas más externas donde se diferencian al cambiar progresivamente sus patrones de expresión génica hasta llegar a un estado neuronal diferenciado y posicionándose en las capas más externas. Dichos cambios graduales de expresión se asocian a 2 puntos: 1) la localización de la neurona en el neuroepitelio, y 2) a los mismos cambios de expresión génica que suceden durante el desarrollo embrionario. Esto sugiere fuertemente que los procesos de diferenciación embrionaria de mamíferos y los procesos de diferenciación periódica de las neuronas del cerebro medio ventral de los ajolotes se conservan, y pueden servir para futuros estudios sobre la diferenciación neuronal.

Para establecer una estrategia experimental donde se eliminen de forma selectiva las neuronas dopaminérgicas del Mesencéfalo ventral se utilizó la inyección intraventricular de 6-OHDA que se ha realizado en otros modelos animales vertebrados e invertebrados (Nishimura et al., 2011; Parish et al., 2007). Se encontró una eliminación progresiva del

marcaje  $\alpha$ -TH que se completa a las 48 horas post-inyección, lo cual coincide con lo reportado en otras especies de mamíferos y salamandras (Hernandez-Baltazar et al., 2017; Parish et al., 2007). El hecho que se hayan encontrado resultados similares sobre la temporalidad de acción de la 6-OHDA entre diferentes organismos sugiere que los mecanismos tanto de recepción de la señal del neurotóxico, así como de la propagación de la señal pro-muerte en las neuronas se encuentran conservados entre las especies. Entre los mecanismos con los que la 6-OHDA promueve la muerte neuronal se encuentran: 1) La autooxidación intra o extracelular de 6-OHDA que favorece la formación de Peróxido de Hidrógeno y la formación de los radicales Superóxido e Hidroxilil; 2) La Formación de Peróxido de Hidrógeno por la acción de la Monoamina Oxidasa; y 3) la Inhibición directa de los Complejos I y IV mitocondriales de la cadena transportadora de electrones (Glinka et al., 1997). Hasta la fecha no existen estudios donde comprueben el aumento de las Especies Reactivas de Oxígeno tras la inyección de 6-OHDA en el cerebro del ajolote y su relación con la eliminación de las neuronas catecolaminérgicas, por lo que estudiarlos confirmaría o rechazaría la idea sobre la conservación sobre la transducción de la señal de 6-OHDA entre diferentes organismos.

De igual forma, para confirmar que la muerte celular es específica a un solo tipo neuronal se realizó el ensayo de TUNEL a las 6 y 12 hpi. Como resultado se encontró que las neuronas TH<sup>+</sup> son TUNEL<sup>+</sup> a las 6 hpi, y la marca de TUNEL disminuye a las 12 hpi, al igual que la marca de TH. El ensayo TUNEL se ha asociado directamente a eventos de apoptosis celular al detectar la fragmentación del DNA (Kyrylkova et al., 2012), por lo tanto, los resultados sugieren que existe una fragmentación del DNA específica en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral que conducen a su muerte y completa ausencia a las 48 hpi de 6-OHDA. Sin embargo, se ha descrito que la fragmentación del material genético no es específica de una muerte celular mediada por apoptosis. Una vez que se produce un daño al DNA de cadena sencilla o doble se puede arrestar el ciclo celular y reparar el daño, o inducir la muerte celular por vía apoptótica, necrótica, o autofagia. La diferencia radica en el contexto celular al momento del daño al DNA, y la activación de diferentes complejos proteicos como p53, PARP, o la vía de TSC2/mTOR, respectivamente (Surova & Zhivotovsky, 2013). Por esto último, si se quiere estudiar con mayor detenimiento qué tipo

de muerte celular induce la 6-OHDA en el mesencéfalo del ajolote, es necesario estudiar la activación in situ de los complejos proteicos antes mencionados.

Como siguiente punto se estudió la proliferación de los progenitores neurales a través de un doble marcaje  $\alpha$ -GFAP/ $\alpha$ -PCNA. Uno de los primeros eventos celulares reportados tras lesiones del CNS en animales regenerantes es la proliferación de los progenitores neurales (Lust & Tanaka, 2019; Sabin et al., 2019; Walker et al., 2022). En el presente trabajo, el primer momento donde se detectan células doble positivas es a las 24 hpi, que coincide con el momento donde se observa la eliminación de los somas TH<sup>+</sup>, indicando que la falta de estas neuronas es el primer paso para activar los procesos de regeneración. Estudios donde se evalúa la eliminación de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo de la salamandra *Pleurodeles waltl*, se establece que la señal que inicia la regeneración de las neuronas dopaminérgicas es la ausencia de dopamina (Berg et al., 2010, 2013). Con ello, se propone un modelo donde existe una población de ERGs que se encuentran quiescentes en condiciones hemostáticas, y, tras la falta de dopamina, se reactiva su ciclo celular, prolifera y se diferencia para regenerar las neuronas faltantes. Una vez regeneradas las neuronas dopaminérgicas, el nivel de dopamina se restablece, y las ERGs regresan a un estado de quiescencia (Berg et al., 2010). Esto último podría estar pasando en el ajolote, por lo que también explica el por qué la proliferación se da en algunas ERGs, y no en todas al mismo tiempo. En el mismo sentido, conocer el tiempo exacto donde las ERGs comienzan a proliferar nos brinda los tiempos exactos para poder estudiar el inicio de los procesos de diferenciación neural.

Es interesante que a las 48 hpi de 6-OHDA se observa una gran cantidad de células PCNA<sup>+</sup>. Estas células son tanto progenitoras al tener el marcaje en conjunto con GFAP, así como neuronas diferenciadas al estar localizada la marca de PCNA en las zonas SVZ y MZ. Observar un marcaje característico de proliferación celular en una zona diferente a la VZ tras las 48 hpi de 6-OHDA puede explicarse como dos diferentes posibilidades: 1) Estas células son células de amplificación transitoria que provienen de las ERG que empezaron a proliferar a las 24 y 36 hpi de 6-OHDA; o 2) hay una participación de las neuronas diferenciadas en el proceso de regeneración de las neuronas dopaminérgicas donde estarían implicados procesos de desdiferenciación o transdiferenciación de estas células. Para el primer punto, se ha descrito que, durante el desarrollo embrionario de varios organismos, los progenitores

neurales proliferan asimétricamente para amplificar el número de progenitores intermedios para tener una cantidad adecuada de neuroblastos que se diferencien a diferentes tipos neurales (Bello et al., 2008; Pilz et al., 2013). Para el segundo punto, se ha descrito que la replicación del DNA es uno de los eventos celulares que suceden durante la desdiferenciación y transdiferenciación celular (Eguchi & Kodama, 1993; Reid & Tursun, 2018; Witzgall et al., 1994). Actualmente en los daños del CNS reportados en salamandras sólo se ha observado una regeneración mediada por la proliferación de las células endimogliales (Sabin et al., 2019; Wei et al., 2022). Así, en ningún caso se ha descrito la participación de las células diferenciadas preexistentes al daño en el proceso de regeneración neural, por lo que, de ser cierto, sería el primer evento donde se describiría este fenómeno. Para dilucidar el grado de participación de las células endimogliales y de las neuronas diferenciadas es necesario realizar estudios de trazado de linaje durante la regeneración de las neuronas dopaminérgicas. Marcar las células progenitoras antes de la inyección intraventricular con 6-OHDA daría como resultado el marcaje de la proporción de neuronas TH<sup>+</sup> que provienen de las células endimogliales, dejando sin marca la proporción que provienen de neuronas diferenciadas.

En este estudio encontramos la reaparición de las neuronas TH<sup>+</sup> a los 10 dpi. Sin embargo, la localización de estas neuronas es en la SVZ del mesencéfalo ventral, lo que indica que posiblemente no se encuentran diferenciadas. Para comprobar este último punto se pueden realizar una doble inmunofluorescencia  $\alpha$ -NeuN. La caracterización de las ERGs y su participación en la regeneración de neuronas catecolaminérgicas se ha realizado en estudios en la salamandra *Pleurodeles waltl*, donde las neuronas TH<sup>+</sup> se encuentran regeneradas a los 40 días post lesión (Berg et al., 2010; Parish et al., 2007). Aunque el ajolote y la salamandra son organismos filogenéticamente cercanos, y comparten habilidades de regeneración, se ha propuesto que difieren en las capacidades neurogénicas ya que se ha demostrado que en el mesencéfalo del ajolote existe un mayor número de nichos neurogénicos en condiciones homeostáticas (Maden et al., 2013), mientras que la salamandra carece de ello (Parish et al., 2007). Por esa razón, es razonable pensar que podrían tener diferentes temporalidades en el proceso de regeneración. Sin embargo, en este trabajo se encontró que la dinámica de regeneración tras la inyección de 6-OHDA es muy similar a las salamandras, posiblemente indicando que la activación de las ERGs, así como los procesos de proliferación y

diferenciación de éstas hacia linaje dopaminérgico son similares entre las especies, de manera contraria a lo que se pensaba.

En este punto también es interesante investigar en qué tiempo se encuentran completamente regeneradas las neuronas dopaminérgicas. Para investigar esto, se pueden realizar registros electrofisiológicos de las neuronas a los 10 y 20 dpi para corroborar si la fisiología neuronal característica de las neuronas dopaminérgicas está completamente restaurada. Mediciones en el potencial de membrana, de los picos de despolarización mediados por canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y su inhibición con tratamientos de tetrodotoxinas (Grace & Onn, 1989; Shi, 2009) son evaluaciones que se tendrían que hacer para corroborar este último punto.

Al estudiar los cambios de expresión de genes asociados a la diferenciación dopaminérgica durante la regeneración, se encontró que éstos varían con el tiempo. Si se categorizan los genes, se encontró que los genes asociados a la especificación de los progenitores neurales se sobreexpresan a tiempos más cortos, mientras que los genes asociados a determinación celular hacia linaje dopaminérgico están sobreexpresados a tiempos posteriores, coincidiendo con lo que ocurre durante el desarrollo embrionario (Arenas et al., 2015). Esto indica que los procesos de diferenciación neural son similares entre la embriogénesis y la regeneración de estas neuronas. También, en los tiempos evaluados no se observó un regreso a los niveles de expresión antes del daño, porque la diferenciación y la regeneración continúa activa a mayor tiempo de los 10 dpi. Por último, para saber con exactitud que células están teniendo la sobreexpresión génica, es necesario obtener los patrones de expresión de estos genes mediante HCR-FISH a los 2, 5 y 10 dpi.

Otro resultado interesante es que no se truncó la expresión de *Th*, aun cuando las neuronas  $\text{TH}^+$  ya se habían eliminado. Esto se puede explicar ya que, durante el proceso de diferenciación embrionaria de las neuronas dopaminérgicas, la expresión de *Th* inicia desde la especificación de los progenitores neurales a una región del cerebro medio ventral, y su traducción se inhibe hasta fases posteriores (Hegarty et al., 2013; M. Wang et al., 2020). Esto mismo puede estar ocurriendo durante el proceso de regeneración. Para comprobar este punto es necesario obtener el patrón de expresión de *Th* en diferentes puntos de la regeneración de

las neuronas dopaminérgicas y ver si la expresión colocaliza con células en la VZ, SVZ, o MZ.

Una de las vías de señalización que se hipotetizó que podría estar implicada en el proceso de regeneración de las neuronas dopaminérgicas fue la del ácido retinoico, conocida por modular eventos neurogénicos durante el desarrollo embrionario (Maden, 2002). Dado que el AR es una molécula que difunde libremente a través de la barrera hematoencefálica (Bonney & Siegenthaler, 2017; Mizee et al., 2013), se decidió inyectar la solución de AR intraperitonealmente y medir los niveles de respuesta de RAR $\gamma$ , un gen de respuesta a ácido retinoico (Lehmann et al., 1992). Se encontró que la concentración de 150  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  indujo una respuesta más fuerte, que es la misma concentración que se ha utilizado en otros estudios de ácido retinoico y regeneración en ajolotes (Monkemeyer et al., 1992).

Al inyectar el ácido retinoico durante el proceso de regeneración se encontró que hay una sobreexpresión de genes asociados a progenitores neurales a los 2 dpi. El ácido retinoico induce la expresión de SOX2 y es utilizado para inducir y mantener la troncalidad en las Células Troncales Embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés) (Tagliaferri et al., 2020; Zhang et al., 2015), por lo que es posible que también lo esté haciendo en las ERGs del mesencéfalo del ajolote. En este punto no se sabe con certeza si las células competentes al AR son los progenitores neurales u otro tipo celular que se encuentre en el cerebro o en los tejidos aledaños. Para ello, es necesario buscar la expresión de los receptores de AR (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , y los RXR) en el cerebro, al mismo tiempo que un marcador de las ERGs como SOX2 o GFAP. Otra posibilidad es utilizar líneas transgénicas que tienen la expresión de la proteína verde fluorescente bajo el elemento de respuesta de ácido retinoico (RARE), previamente reportado (Monaghan & Maden, 2012). El hecho que el AR esté manteniendo el estado indiferenciado de las ERGs también explica la baja expresión de los genes de especificación y determinación que se encontraron hasta los 10 dpi de la inyección con 6-OHDA.



## ***XIV. CONCLUSIONES***

En el presente trabajo se encontró que la distribución de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro del ajolote es similar al de las salamandras, y otros vertebrados. Sin embargo, los perfiles de expresión de algunos genes no son iguales a los de las neuronas dopaminérgicas de los ratones por lo que podría haber diferencias fisiológicas entre las neuronas de estos dos organismos, así como el uso de estas neuronas en diferentes redes neuronales.

También, se demostró que se puede inducir la muerte neuronal específica de las neuronas dopaminérgicas con la inyección intraventricular de 6-OHDA, y de la misma manera se demostró que el mesencéfalo del ajolote tiene la capacidad de regenerar estas neuronas a los 20 días después del daño. Durante el proceso de regeneración, el mesencéfalo del ajolote tiene cambios en sus perfiles de expresión génica similares a los observados durante el desarrollo embrionario, por lo que los procesos de diferenciación de las neuronas dopaminérgicas se recapitulan tras una eliminación selectiva de ellas. Esto indica que los procesos neurogénicos de las neuronas dopaminérgicas son similares durante el desarrollo embrionario y la neuro-regeneración de los organismos adultos.

Como última parte del proyecto, se aumentaron los niveles de ácido retinoico durante la regeneración de neuronas dopaminérgicas, lo cual indujo solamente la activación y proliferación de los progenitores neurales, y al mismo tiempo inhibió su diferenciación, indicando que el ácido retinoico juega un papel importante al mantener indiferenciados a los progenitores neurales, sugiriendo que dicha señalización debe ser apagada/disminuida para poder iniciar los procesos neurogénicos durante la regeneración de las neuronas dopaminérgicas.

Este estudio señala la importancia de estudiar la regeneración de un tipo neuronal a la vez, ya que permite estudiar el proceso de diferenciación de las células troncales/progenitoras neuronales con mayor precisión. Asimismo, esta metodología nos permite modular diferentes eventos celulares para dilucidar su regulación, y entender a mayor profundidad la biología de las células troncales neuronales del ajolote.

## ***XV. PERSPECTIVAS***

1. Realizar trazados de linajes de progenitores SOX2<sup>+</sup> (o GFAP<sup>+</sup>) durante la regeneración de neuronas dopaminérgicas.
2. Obtener patrones de expresión de genes asociados a la diferenciación dopaminérgica durante el proceso de regeneración
3. Obtener patrones de expresión de los diferentes receptores de ácido retinoico en condiciones homeostáticas y de regeneración de neuronas dopaminérgicas para evaluar la competencia de las células progenitoras (o neuronas diferenciadas) a la señalización del RA.
4. Realizar Tratamientos con PAN-antagonistas de los receptores de ácido retinoico donde se pueda inducir la expresión de los genes de diferenciación a linaje dopaminérgico y acelerar los procesos de regeneración
5. Realizar ensayos electrofisiológicos en neuronas regeneradas a los 10 y 20 dpi para demostrar la regeneración a nivel fisiológico de las neuronas
6. Realizar reconstrucciones tridimensionales del cerebro completo con marcaje  $\alpha$ -TH antes y después de la regeneración para visualizar el grado de regeneración del conectoma de estas neuronas.
7. Estudiar el proceso de regeneración al modular otras vías de señalización con FGF o WNT cuyo papel se ha demostrado últimamente en la ERGs.
8. Estudiar la regeneración a nivel conductual del ajolote tras la ablación de las neuronas dopaminérgicas con estudios que involucren el análisis de los cambios de motricidad del organismo.

## ***XVI. REFERENCIAS***

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., & Brûlet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*  $-/-$  mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development*, *121*(10), 3279–3290. <https://doi.org/10.1242/dev.121.10.3279>
- Altman, J. (1962). Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? *Science*, *135*(3509), 1127–1128. <https://doi.org/10.1126/science.135.3509.1127>
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, *124*(3), 319–335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>
- Amamoto, R., Huerta, V. G. L., Takahashi, E., Dai, G., Grant, A. K., Fu, Z., & Arlotta, P. (2016). Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *ELife*, *5*. <https://doi.org/10.7554/eLife.13998>
- Arenas, E., Denham, M., & Villaescusa, J. C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development*, *142*(11), 1918–1936. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>
- Arnold, C. P., Benham-Pyle, B. W., Lange, J. J., Wood, C. J., & Sánchez Alvarado, A. (2019). Wnt and TGF $\beta$  coordinate growth and patterning to regulate size-dependent behaviour. *Nature*, *572*(7771), 655–659. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1478-7>
- Bally-Cuif, L., & Wassef, M. (1994). Ectopic induction and reorganization of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development*, *120*(12), 3379–3394. <https://doi.org/10.1242/dev.120.12.3379>
- Barbosa, J. S., Sanchez-Gonzalez, R., Di Giaimo, R., Baumgart, E. V., Theis, F. J., Gotz, M., & Ninkovic, J. (2015). Live imaging of adult neural stem cell behavior in the intact and injured zebrafish brain. *Science*, *348*(6236), 789–793. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2729>
- Becker, C. G., & Becker, T. (2015). Neuronal Regeneration from Ependymo-Radial Glial Cells: Cook, Little Pot, Cook! *Developmental Cell*, *32*(4), 516–527. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.001>
- Beliveau, B. J., Kishi, J. Y., Nir, G., Sasaki, H. M., Saka, S. K., Nguyen, S. C., Wu, C., & Yin, P. (2018). OligoMiner provides a rapid, flexible environment for the design of genome-scale oligonucleotide in situ hybridization probes. *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences*, 115(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.1714530115>

- Bello, B. C., Izergina, N., Caussinus, E., & Reichert, H. (2008). Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Development*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-5>
- Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., & LoTurco, J. J. (2003). Electrophysiological Differentiation of New Neurons in the Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience*, 23(32), 10411–10418. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-32-10411.2003>
- Berg, D. A., Belnoue, L., Song, H., & Simon, A. (2013). Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development*, 140(12), 2548–2561. <https://doi.org/10.1242/dev.088005>
- Berg, D. A., Kirkham, M., Beljajeva, A., Knapp, D., Habermann, B., Ryge, J., Tanaka, E. M., & Simon, A. (2010). Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Development*, 137(24), 4127–4134. <https://doi.org/10.1242/dev.055541>
- Bianco, I. H., & Wilson, S. W. (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1519), 1005–1020. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0213>
- Björklund, A., & Parmar, M. (2021). Dopamine Cell Therapy: From Cell Replacement to Circuitry Repair. *Journal of Parkinson's Disease*, 11(s2), S159–S165. <https://doi.org/10.3233/JPD-212609>
- Bonney, S., & Siegenthaler, J. A. (2017). Differential Effects of Retinoic Acid Concentrations in Regulating Blood–Brain Barrier Properties. *Eneuro*, 4(3), ENEURO.0378-16.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0378-16.2017>
- Bryant, D. M., Sousounis, K., Payzin-Dogru, D., Bryant, S., Sandoval, A. G. W., Martinez Fernandez, J., Mariano, R., Oshiro, R., Wong, A. Y., Leigh, N. D., Johnson, K., & Whited, J. L. (2017). Identification of regenerative roadblocks via repeat deployment of limb regeneration in axolotls. *Npj Regenerative Medicine*, 2(1), 30. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0034-z>
- Burd, G. D., & Nottebohm, F. (1985). Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 240(2), 143–152.

<https://doi.org/10.1002/cne.902400204>

Burr, H. S. (1916). Regeneration in the brain of amblystoma. I. The regeneration of the forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 26(2), 203–211. <https://doi.org/10.1002/cne.900260203>

Cajal, S. R. y, & May, R. M. (1991). *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System* (J. DeFelipe & E. G. Jones (eds.)). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195065169.001.0001>

Crossley, P. H., Martinez, S., & Martin, G. R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*, 380(6569), 66–68. <https://doi.org/10.1038/380066a0>

Cuervo, R., Hernández-Martínez, R., Chimal-Monroy, J., Merchant-Larios, H., & Covarrubias, L. (2012). Full regeneration of the tribasal *Polypterus* fin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(10), 3838–3843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006619109>

Danielewsky, B. (1890). Über die Regeneration der Grosshirn Hemisphären beim Frosch. *Verh X Inter Med Kongr*, 2.

Danielian, P. S., & McMahon, A. P. (1996). Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature*, 383(6598), 332–334. <https://doi.org/10.1038/383332a0>

Dickinson, R. B., Guido, S., & Tranquillo, R. T. (1994). Biased cell migration of fibroblasts exhibiting contact guidance in oriented collagen gels. *Annals of Biomedical Engineering*, 22(4), 342–356. <https://doi.org/10.1007/BF02368241>

Dolan, C. P., Dawson, L. A., & Muneoka, K. (2018). Digit Tip Regeneration: Merging Regeneration Biology with Regenerative Medicine. *Stem Cells Translational Medicine*, 7(3), 262–270. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0236>

Doucet-Beaupré, H., Gilbert, C., Profes, M. S., Chabrat, A., Pacelli, C., Giguère, N., Rioux, V., Charest, J., Deng, Q., Laguna, A., Ericson, J., Perlmann, T., Ang, S.-L., Cicchetti, F., Parent, M., Trudeau, L.-E., & Lévesque, M. (2016). *Lmx1a* and *Lmx1b* regulate mitochondrial functions and survival of adult midbrain dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.1520387113>

- Drowley, L., McPheat, J., Nordqvist, A., Peel, S., Karlsson, U., Martinsson, S., Müllers, E., Dellsén, A., Knight, S., Barrett, I., Sánchez, J., Magnusson, B., Greber, B., Wang, Q.-D., & Plowright, A. T. (2020). Discovery of retinoic acid receptor agonists as proliferators of cardiac progenitor cells through a phenotypic screening approach. *Stem Cells Translational Medicine*, 9(1), 47–60. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0069>
- Duncan, E. M., & Sánchez Alvarado, A. (2019). Regulation of Genomic Output and (Pluri)potency in Regeneration. *Annual Review of Genetics*, 53(1), 327–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043733>
- Dwight, J., Gurney, J. H., Lea, I., Pallas, P. S., Richmond, C. W., & Tucker, M. B. (1767). *Spicilegia zoologica: quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur / cura P.S. Pallas ...* Prostant apud Gottl. August. Lange,. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.39832>
- Echeverri, K., & Tanaka, E. M. (2002). Ectoderm to Mesoderm Lineage Switching During Axolotl Tail Regeneration. *Science*, 298(5600), 1993–1996. <https://doi.org/10.1126/science.1077804>
- Eguchi, G., Eguchi, Y., Nakamura, K., Yadav, M. C., Millán, J. L., & Tsonis, P. A. (2011). Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing. *Nature Communications*, 2(1), 384. <https://doi.org/10.1038/ncomms1389>
- Eguchi, G., & Kodama, R. (1993). Transdifferentiation. *Current Opinion in Cell Biology*, 5(6), 1023–1028. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90087-7)
- Fei, J.-F., Schuez, M., Tazaki, A., Taniguchi, Y., Roensch, K., & Tanaka, E. M. (2014). CRISPR-Mediated Genomic Deletion of Sox2 in the Axolotl Shows a Requirement in Spinal Cord Neural Stem Cell Amplification during Tail Regeneration. *Stem Cell Reports*, 3(3), 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.06.018>
- Filoni, S., & Gibertini, G. (1969). A study of the regenerative capacity of the central nervous system of anuran amphibia in relation to their stage of development. I. Observations on the regeneration of the optic lobe of *Xenopus laevis* (Daudin) in the larval stages. *Archives de Biologie*, 80(4), 369–411. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5401735>
- Finkenstädt, T., Ebbesson, S. O. E., & Ewert, J.-P. (1983). Projections to the midbrain tectum in *Salamandra salamandra* L. *Cell and Tissue Research*, 234(1). <https://doi.org/10.1007/BF00217401>

- Fitzgerald, H. C., Schust, D. J., & Spencer, T. E. (2021). In vitro models of the human endometrium: evolution and application for women's health+. *Biology of Reproduction*, *104*(2), 282–293. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa183>
- Fritzsch, B., & Himstedt, W. (1980). Anatomy of visual afferents in salamander brain. *Naturwissenschaften*, *67*(4), 203–204. <https://doi.org/10.1007/BF01086312>
- Gale, E., & Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Molecular Brain*, *1*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-1-8>
- Gawriluk, T. R., Simkin, J., Thompson, K. L., Biswas, S. K., Clare-Salzler, Z., Kimani, J. M., Kiama, S. G., Smith, J. J., Ezenwa, V. O., & Seifert, A. W. (2016). Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals. *Nature Communications*, *7*(1), 11164. <https://doi.org/10.1038/ncomms11164>
- Gearhart, M., Erickson, J., Walsh, A., & Echeverri, K. (2015). Identification of Conserved and Novel MicroRNAs during Tail Regeneration in the Mexican Axolotl. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 22046–22061. <https://doi.org/10.3390/ijms160922046>
- Gemberling, M., Bailey, T. J., Hyde, D. R., & Poss, K. D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics*, *29*(11), 611–620. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.07.003>
- Gerber, T., Murawala, P., Knapp, D., Masselink, W., Schuez, M., Hermann, S., Gac-Santel, M., Nowoshilow, S., Kageyama, J., Khattak, S., Currie, J. D., Camp, J. G., Tanaka, E. M., & Treutlein, B. (2018). Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. *Science*, *362*(6413). <https://doi.org/10.1126/science.aaq0681>
- Ghyselinck, N. B., & Duester, G. (2019). Retinoic acid signaling pathways. *Development*, *146*(13). <https://doi.org/10.1242/dev.167502>
- Gibbs, K. M., Chittur, S. V., & Szaro, B. G. (2011). Metamorphosis and the regenerative capacity of spinal cord axons in *Xenopus laevis*. *European Journal of Neuroscience*, *33*(1), 9–25. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07477.x>
- Gierer, A. (2012). The Hydra model - a model for what? *The International Journal of Developmental Biology*, *56*(6-7-8), 437–445. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113458ag>

- Glinka, Y., Gassen, M., & Youdim, M. B. H. (1997). *Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity* (pp. 55–66). [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6842-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6842-4_7)
- Godwin, J. W., & Rosenthal, N. (2014). Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: Immunological influences on regenerative success. *Differentiation*, *87*(1–2), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.02.002>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, *167*(4), 897–914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>
- González, A., López, J. M., Morona, R., & Moreno, N. (2020). The Organization of the Central Nervous System of Amphibians. In *Evolutionary Neuroscience* (pp. 125–157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820584-6.00007-6>
- Gonzalez, A., & Smeets, W. J. A. J. (1991). Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. *The Journal of Comparative Neurology*, *303*(3), 457–477. <https://doi.org/10.1002/cne.903030311>
- González, Agustín, & Smeets, W. J. A. J. (1992). Comparative analysis of the vasotocinergic and mesotocinergic cells and fibers in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. *Journal of Comparative Neurology*, *315*(1), 53–73. <https://doi.org/10.1002/cne.903150105>
- Goss, R. J., & Powel, R. S. (1985). Induction of deer antlers by transplanted periosteum I. Graft size and shape. *Journal of Experimental Zoology*, *235*(3), 359–373. <https://doi.org/10.1002/jez.1402350307>
- Grace, A., & Onn, S. (1989). Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *The Journal of Neuroscience*, *9*(10), 3463–3481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-10-03463.1989>
- Grafí, G. (2009). The complexity of cellular dedifferentiation: implications for regenerative medicine. *Trends in Biotechnology*, *27*(6), 329–332. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.007>
- Grelat, A., Benoit, L., Wagner, S., Moigneu, C., Lledo, P.-M., & Alonso, M. (2018). Adult-born neurons boost odor–reward association. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(12), 6343–6348. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715111115>



- Sciences*, 115(10), 2514–2519. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716400115>
- Gurley, K. A., Rink, J. C., & Alvarado, A. S. (2008).  $\beta$ -Catenin Defines Head Versus Tail Identity During Planarian Regeneration and Homeostasis. *Science*, 319(5861), 323–327. <https://doi.org/10.1126/science.1150029>
- Hegarty, S. V., Sullivan, A. M., & O’Keeffe, G. W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology*, 379(2), 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014>
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología (English Edition)*, 32(8), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.06.019>
- Herrick, C. J. (1927). The amphibian forebrain. IV. The cerebral hemispheres of amblystoma. *The Journal of Comparative Neurology*, 43(2), 231–325. <https://doi.org/10.1002/cne.900430204>
- Herrick, C. J. (1948). *The brain of the tiger salamander, Ambystoma tigrinum*. Univ. of Chicago Press. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6375>
- Hines, P. J., & Marx, J. (1996). Developmental Neurobiology. *Science*, 274(5290), 1099–0. <https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1099>
- Jeffery, W. R. (2015). Distal regeneration involves the age dependent activity of branchial sac stem cells in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Regeneration*, 2(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/reg2.26>
- Joven, A., Morona, R., González, A., & Moreno, N. (2013a). Spatiotemporal patterns of Pax3, Pax6 and Pax7 expression in the developing brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *Journal of Comparative Neurology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/cne.23385>
- Joven, A., Morona, R., González, A., & Moreno, N. (2013b). Expression patterns of Pax6 and Pax7 in the adult brain of a urodele amphibian, *Pleurodeles waltl*. *Journal of Comparative Neurology*, 521(9), 2088–2124. <https://doi.org/10.1002/cne.23276>
- Joven, A., Morona, R., Moreno, N., & González, A. (2013). Regional distribution of calretinin and calbindin-D28k expression in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* during embryonic and larval development. *Brain Structure and*

*Function*, 218(4), 969–1003. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0442-1>

Joven, A., & Simon, A. (2018). Homeostatic and regenerative neurogenesis in salamanders. *Progress in Neurobiology*, 170, 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.04.006>

Kadkhodaei, B., Ito, T., Joodmardi, E., Mattsson, B., Rouillard, C., Carta, M., Muramatsu, S.-I., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Metzger, D., Chambon, P., Lindqvist, E., Larsson, N.-G., Olson, L., Björklund, A., Ichinose, H., & Perlmann, T. (2009). Nurr1 Is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 29(50), 15923–15932. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3910-09.2009>

KIRSCHE, K., & KIRSCHE, W. (1964). [REGENERATIVE PROCESSES IN THE TELEENCEPHALON OF AMBYSTOMA MEXICANUM]. *Journal Fur Hirnforschung*, 7, 421–436. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14248567>

Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., Nixon, R. A., & Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>

Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., & Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development*, 138(22), 4831–4841. <https://doi.org/10.1242/dev.072587>

Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). *Detection of Apoptosis by TUNEL Assay* (pp. 41–47). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-860-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-860-3_5)

Laguna, A., Schintu, N., Nobre, A., Alvarsson, A., Volakakis, N., Jacobsen, J. K., Gómez-Galán, M., Sopova, E., Joodmardi, E., Yoshitake, T., Deng, Q., Kehr, J., Ericson, J., Svenningsson, P., Shupliakov, O., & Perlmann, T. (2015). Dopaminergic control of autophagic-lysosomal function implicates Lmx1b in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 18(6), 826–835. <https://doi.org/10.1038/nn.4004>

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>

Lazcano, I., Cisneros-Mejorado, A., Concha, L., Ortiz-Retana, J. J., Garza-Villarreal, E. A., & Orozco, A. (2021). MRI- and histologically derived neuroanatomical atlas of the *Ambystoma mexicanum* (axolotl). *Scientific Reports*, 11(1), 9850.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-89357-3>

- Le, W., Zhang, L., Xie, W., Li, S., & Dani, J. A. (2015). Pitx3 deficiency produces decreased dopamine signaling and induces motor deficits in Pitx3(−/−) mice. *Neurobiology of Aging*, 36(12), 3314–3320. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.012>
- Lehmann, J. M., Zhang, X. K., & Pfahl, M. (1992). RAR gamma 2 expression is regulated through a retinoic acid response element embedded in Sp1 sites. *Molecular and Cellular Biology*, 12(7), 2976–2985. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.7.2976>
- Lehnhoff, S., Lehnhoff, H., & Trembley, A. (1744). *Hydra and the Birth of Experimental Biology*. Boxwood Press.
- Li, W. L., Chu, M. W., Wu, A., Suzuki, Y., Imayoshi, I., & Komiyama, T. (2018). Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.33006>
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5), a018820. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>
- Lindsey, B. W., Aitken, G. E., Tang, J. K., Khabooshan, M., Douek, A. M., Vandestadt, C., & Kaslin, J. (2019). Midbrain tectal stem cells display diverse regenerative capacities in zebrafish. *Scientific Reports*, 9(1), 4420. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40734-z>
- Lledo, P.-M., & Saghatelian, A. (2005). Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life–death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends in Neurosciences*, 28(5), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.005>
- Lo, D. C., Allen, F., & Brockes, J. P. (1993). Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15), 7230–7234. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.15.7230>
- Long, Y., Yang, Y., Pan, G., & Shen, Y. (2022). New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926752>
- López, J. (2003). Ontogeny of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Developmental Brain Research*, 140(1), 29–43. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(02\)00571-0](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(02)00571-0)

- Lust, K., Maynard, A., Gomes, T., Fleck, J. S., Camp, J. G., Tanaka, E. M., & Treutlein, B. (2022). Single-cell analyses of axolotl telencephalon organization, neurogenesis, and regeneration. *Science*, 377(6610). <https://doi.org/10.1126/science.abp9262>
- Lust, K., & Tanaka, E. M. (2019). A Comparative Perspective on Brain Regeneration in Amphibians and Teleost Fish. *Developmental Neurobiology*, 79(5), 424–436. <https://doi.org/10.1002/dneu.22665>
- Luttrell, S. M., Gotting, K., Ross, E., Alvarado, A. S., & Swalla, B. J. (2016). Head regeneration in hemichordates is not a strict recapitulation of development. *Developmental Dynamics*, 245(12), 1159–1175. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24457>
- 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., Manwell, L. A., & Ormerod, B. K. (2013). Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural Development*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-1>
- Manco, R., Leclercq, I. A., & Clerbaux, L.-A. (2018). Liver Regeneration: Different Sub-Populations of Parenchymal Cells at Play Choreographed by an Injury-Specific Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4115. <https://doi.org/10.3390/ijms19124115>
- Marin, F., & Puelles, L. (1994). Patterning of the Embryonic Avian Midbrain after Experimental Inversions: A Polarizing Activity from the Isthmus. *Developmental Biology*, 163(1), 19–37. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1120>
- März, M., Schmidt, R., Rastegar, S., & Strähle, U. (2011). Regenerative response following stab injury in the adult zebrafish telencephalon. *Developmental Dynamics*, 240(9), 2221–2231. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22710>
- Marín, O., Smeets, W. J. A. J., & González, A. (1997a). Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of anuran (*Rana perezi*, *Xenopus laevis*) and urodele (*Pleurodeles waltl*) amphibians. *The Journal of Comparative Neurology*, 382(4), 499–534. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970616\)382:4<499::AID-CNE6>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970616)382:4<499::AID-CNE6>3.0.CO;2-Y)
- Marín, O., Smeets, W. J. A. J., & González, A. (1997b). Basal ganglia organization in amphibians: development of striatal and nucleus accumbens connections with emphasis

on the catecholaminergic inputs. *The Journal of Comparative Neurology*, 383(3), 349–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970707\)383:3<349::AID-CNE6>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970707)383:3<349::AID-CNE6>3.0.CO;2-3)

McKeown, C. R., Sharma, P., Sharipov, H. E., Shen, W., & Cline, H. T. (2013). Neurogenesis is required for behavioral recovery after injury in the visual system of *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Neurology*, 521(10), 2262–2278. <https://doi.org/10.1002/cne.23283>

McLean, J., & Shipley, M. (1988). Postmitotic, postmigrational expression of tyrosine hydroxylase in olfactory bulb dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience*, 8(10), 3658–3669. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-10-03658.1988>

McMahon, A. P., & Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62(6), 1073–1085. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90385-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90385-R)

Mendes-Pinheiro, B., Soares-Cunha, C., Marote, A., Loureiro-Campos, E., Campos, J., Barata-Antunes, S., Monteiro-Fernandes, D., Santos, D., Duarte-Silva, S., Pinto, L., & José Salgado, A. (2021). Unilateral Intrastratial 6-Hydroxydopamine Lesion in Mice: A Closer Look into Non-Motor Phenotype and Glial Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11530. <https://doi.org/10.3390/ijms222111530>

Miller, B. M., Johnson, K., & Whited, J. L. (2019). Common themes in tetrapod appendage regeneration: a cellular perspective. *EvoDevo*, 10(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13227-019-0124-7>

Ming, G., & Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>

Mizee, M. R., Wooldrik, D., Lakeman, K. A. M., van het Hof, B., Drexhage, J. A. R., Geerts, D., Bugiani, M., Aronica, E., Mebius, R. E., Prat, A., de Vries, H. E., & Reijerkerk, A. (2013). Retinoic Acid Induces Blood–Brain Barrier Development. *The Journal of Neuroscience*, 33(4), 1660–1671. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1338-12.2013>

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>

- Monkemeyer, J., Ludolph, D. C., Cameron, J. A., & Stocum, D. L. (1992). Retinoic acid-induced change in anteroposterior positional identity in regenerating axolotl limbs is dose-dependent. *Developmental Dynamics*, *193*(3), 286–294. <https://doi.org/10.1002/aja.1001930309>
- Montagnani, S., Rueger, M. A., Hosoda, T., & Nurzynska, D. (2016). Adult Stem Cells in Tissue Maintenance and Regeneration. *Stem Cells International*, *2016*, 1–2. <https://doi.org/10.1155/2016/7362879>
- Monzón-Sandoval, J., Poggiolini, I., Ilmer, T., Wade-Martins, R., Webber, C., & Parkkinen, L. (2020). <scp>Human-Specific</scp> Transcriptome of Ventral and Dorsal Midbrain Dopamine Neurons. *Annals of Neurology*, *87*(6), 853–868. <https://doi.org/10.1002/ana.25719>
- Moreno, N, López, J. ., Sánchez-Camacho, C., & González, A. (2002). Development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *23*(2), 105–121. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(01\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(01)00146-6)
- Moreno, Nerea. (2007). Regionalization of the telencephalon in urodele amphibians and its bearing on the identification of the amygdaloid complex. *Frontiers in Neuroanatomy*, *1*. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.001.2007>
- Moreno, Nerea, & González, A. (2007). Evolution of the amygdaloid complex in vertebrates, with special reference to the anamnio-amniotic transition. *Journal of Anatomy*, *211*(2), 151–163. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00780.x>
- MORGAN, T. H. (1901). REGENERATION OF PROPORTIONATE STRUCTURES IN STENTOR. *The Biological Bulletin*, *2*(6), 311–328. <https://doi.org/10.2307/1535709>
- Morona, R., & González, A. (2008). Calbindin-D28k and calretinin expression in the forebrain of anuran and urodele amphibians: Further support for newly identified subdivisions. *The Journal of Comparative Neurology*, *511*(2), 187–220. <https://doi.org/10.1002/cne.21832>
- Morona, R., & González, A. (2009). Immunohistochemical localization of calbindin-D28k and calretinin in the brainstem of anuran and urodele amphibians. *The Journal of Comparative Neurology*, *515*(5), 503–537. <https://doi.org/10.1002/cne.22060>
- Morriss-Kay, G. M., Murphy, P., Hill, R. E., & Davidson, D. R. (1991). Effects of retinoic

- acid excess on expression of Hox-2.9 and Krox-20 and on morphological segmentation in the hindbrain of mouse embryos. *The EMBO Journal*, *10*(10), 2985–2995. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07849.x>
- Naujoks-Manteuffel, C., & Manteuffel, G. (1988). Origins of descending projections to the medulla oblongata and rostral medulla spinalis in the urodele *Salamandra salamandra* (amphibia). *The Journal of Comparative Neurology*, *273*(2), 187–206. <https://doi.org/10.1002/cne.902730205>
- Naujoks-Manteuffel, C., Sonntag, R., & Fritzschn, B. (1991). Development of the amphibian oculomotor complex: Evidences for migration of oculomotor motoneurons across the midline. *Anatomy and Embryology*, *183*(6). <https://doi.org/10.1007/BF00187903>
- Nishimura, K., Inoue, T., Yoshimoto, K., Taniguchi, T., Kitamura, Y., & Agata, K. (2011). Regeneration of dopaminergic neurons after 6-hydroxydopamine-induced lesion in planarian brain. *Journal of Neurochemistry*, *119*(6), 1217–1231. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07518.x>
- Northcutt, R. G., & Kicliter, E. (1980). Organization of the Amphibian Telencephalon. In *Comparative Neurology of the Telencephalon* (pp. 203–255). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2988-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2988-6_8)
- Nowoshilow, S., Schloissnig, S., Fei, J.-F., Dahl, A., Pang, A. W. C., Pippel, M., Winkler, S., Hastie, A. R., Young, G., Roscito, J. G., Falcon, F., Knapp, D., Powell, S., Cruz, A., Cao, H., Habermann, B., Hiller, M., Tanaka, E. M., & Myers, E. W. (2018). The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, *554*(7690), 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature25458>
- Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*, *146*(4). <https://doi.org/10.1242/dev.156059>
- Parish, C. L., Beljajeva, A., Arenas, E., & Simon, A. (2007). Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development*, *134*(15), 2881–2887. <https://doi.org/10.1242/dev.002329>
- Patel, K., & Sun, D. (2016). Strategies targeting endogenous neurogenic cell response to improve recovery following traumatic brain injury. *Brain Research*, *1640*, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.055>

- Paton, J. A., & Nottebohm, F. N. (1984). Neurons Generated in the Adult Brain Are Recruited into Functional Circuits. *Science*, 225(4666), 1046–1048. <https://doi.org/10.1126/science.6474166>
- Pfefferli, C., & Jazwińska, A. (2015). The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration*, 2(2), 72–83. <https://doi.org/10.1002/reg2.33>
- Pignatelli, A., & Belluzzi, O. (2010). Neurogenesis in the Adult Olfactory Bulb. In *The Neurobiology of Olfaction*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388302>
- Pilz, G.-A., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., Ninkovic, J., Snippet, H. J., Clevers, H., Godinho, L., Guillemot, F., Borrell, V., Matsuzaki, F., & Götz, M. (2013). Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nature Communications*, 4(1), 2125. <https://doi.org/10.1038/ncomms3125>
- Porrello, E. R., Mahmoud, A. I., Simpson, E., Hill, J. A., Richardson, J. A., Olson, E. N., & Sadek, H. A. (2011). Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science*, 331(6020), 1078–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1200708>
- Qin, T., Zhang, G., Zheng, Y., Li, S., Yuan, Y., Li, Q., Hu, M., Si, H., Wei, G., Gao, X., Cui, X., Xia, B., Ren, J., Wang, K., Ba, H., Liu, Z., Heller, R., Li, Z., Wang, W., ... Qiu, Q. (2023). A population of stem cells with strong regenerative potential discovered in deer antlers. *Science*, 379(6634), 840–847. <https://doi.org/10.1126/science.add0488>
- Reid, A., & Tursun, B. (2018). Transdifferentiation: do transition states lie on the path of development? *Current Opinion in Systems Biology*, 11, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.07.004>
- Rothenaigner, I., Krecsmarik, M., Hayes, J. A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., Götz, M., Jagasia, R., & Bally-Cuif, L. (2011). Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate. *Development*, 138(8), 1459–1469. <https://doi.org/10.1242/dev.058156>
- Rubenstein, J. L. R., & Puellas, L. (1994). *1 Homeobox Gene Expression during Development of the Vertebrate Brain* (pp. 1–63). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60546-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60546-3)
- Rudolf Nieuwenhuys, Hendrik Jan Donkelaar, Hans J. ten Donkelaar, C. N. (1998). *The*



*Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Science & Business Media.

- Sabin, K. Z., Jiang, P., Gearhart, M. D., Stewart, R., & Echeverri, K. (2019). AP-1cFos/JunB/miR-200a regulate the pro-regenerative glial cell response during axolotl spinal cord regeneration. *Communications Biology*, 2(1), 91. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0335-4>
- Sasidharan, V., & Sánchez Alvarado, A. (2022). The Diverse Manifestations of Regeneration and Why We Need to Study Them. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(9), a040931. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040931>
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Dressler, G., Pavel Urbánek, Busslinger, M., & Gruss, P. (1999). Pax2/5 and Pax6 subdivide the early neural tube into three domains. *Mechanisms of Development*, 82(1–2), 29–39. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00005-2)
- Seifert, A. W., & Currie, J. D. (Eds.). (2023). *Salamanders* (Vol. 2562). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2659-7>
- Seifert, A. W., Kiama, S. G., Seifert, M. G., Goheen, J. R., Palmer, T. M., & Maden, M. (2012). Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature*, 489(7417), 561–565. <https://doi.org/10.1038/nature11499>
- 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>
- Shawlot, W., & Behringer, R. R. (1995). Requirement for L1ml in head-organizer function. *Nature*, 374(6521), 425–430. <https://doi.org/10.1038/374425a0>
- Shi, W.-X. (2009). Electrophysiological Characteristics of Dopamine Neurons: A 35-Year Update. In *Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra* (pp. 103–119). Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-92660-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-211-92660-4_8)
- Smith, J. J., Timoshevskaya, N., Timoshevskiy, V. A., Keinath, M. C., Hardy, D., & Voss, S. R. (2019). A chromosome-scale assembly of the axolotl genome. *Genome Research*, 29(2), 317–324. <https://doi.org/10.1101/gr.241901.118>
- Srebro, Z. (1958). Regeneration of the endbrain in *Xenopus laevis* tadpoles. *Folia Biologica Krakow*, 5, 211–231.
- Srebro, Z. (1965). Endbrain regeneration in adult *Xenopus laevis*. *Folia Biologica*, 13(3),

269–280. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5859613>

- Sun, D. (2016). Endogenous neurogenic cell response in the mature mammalian brain following traumatic injury. *Experimental Neurology*, 275, 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.04.017>
- Surova, O., & Zhivotovsky, B. (2013). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*, 32(33), 3789–3797. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.556>
- Tagliaferri, D., Mazzone, P., Noviello, T. M. R., Addeo, M., Angrisano, T., Del Vecchio, L., Visconte, F., Ruggieri, V., Russi, S., Caivano, A., Cantone, I., De Felice, M., Ceccarelli, M., Cerulo, L., & Falco, G. (2020). Retinoic Acid Induces Embryonic Stem Cells (ESCs) Transition to 2 Cell-Like State Through a Coordinated Expression of Dux and Duxbl1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00385>
- Tanaka, E. M., & Reddien, P. W. (2011). The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Developmental Cell*, 21(1), 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.016>
- Theodosiou, M., Laudet, V., & Schubert, M. (2010). From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(9), 1423–1445. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0268-z>
- Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1990). Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature*, 346(6287), 847–850. <https://doi.org/10.1038/346847a0>
- Urata, Y., Yamashita, W., Inoue, T., & Agata, K. (2018). Spatio-temporal neural stem cell behavior leads to both perfect and imperfect structural brain regeneration in adult newts. *Biology Open*, 7(6). <https://doi.org/10.1242/bio.033142>
- Varadarajan, S. G., Hunyara, J. L., Hamilton, N. R., Kolodkin, A. L., & Huberman, A. D. (2022). Central nervous system regeneration. *Cell*, 185(1), 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.029>
- Walker, S. E., Sabin, K. Z., Gearhart, M. D., Yamamoto, K., & Echeverri, K. (2022). Regulation of stem cell identity by miR-200a during spinal cord regeneration. *Development*, 149(3). <https://doi.org/10.1242/dev.200033>
- Wang, M., Ling, K.-H., Tan, J., & Lu, C.-B. (2020). Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells*, 9(6), 1489.

<https://doi.org/10.3390/cells9061489>

- Wang, Z., Cui, M., Shah, A. M., Ye, W., Tan, W., Min, Y.-L., Botten, G. A., Shelton, J. M., Liu, N., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2019). Mechanistic basis of neonatal heart regeneration revealed by transcriptome and histone modification profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(37), 18455–18465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905824116>
- Wei, X., Fu, S., Li, H., Liu, Y., Wang, S., Feng, W., Yang, Y., Liu, X., Zeng, Y.-Y., Cheng, M., Lai, Y., Qiu, X., Wu, L., Zhang, N., Jiang, Y., Xu, J., Su, X., Peng, C., Han, L., ... Gu, Y. (2022). Single-cell Stereo-seq reveals induced progenitor cells involved in axolotl brain regeneration. *Science*, *377*(6610). <https://doi.org/10.1126/science.abp9444>
- Wenk, H., & Winkelmann, E. (1972). Experimentelle Untersuchungen über enzymhistochemische Veränderungen im olfaktorischen System von *Ambystoma mexicanum* nach einseitiger Resektion des Riechorgans. In *1972/1973* (pp. 1–22). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783112532645-001>
- Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C., & Bonventre, J. V. (1994). Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *Journal of Clinical Investigation*, *93*(5), 2175–2188. <https://doi.org/10.1172/JCI117214>
- Xavier-Neto, J., Sousa Costa, Â. M., Figueira, A. C. M., Caiaffa, C. D., Amaral, F. N. do, Peres, L. M. C., da Silva, B. S. P., Santos, L. N., Moise, A. R., & Castillo, H. A. (2015). Signaling through retinoic acid receptors in cardiac development: Doing the right things at the right times. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1849*(2), 94–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.08.003>
- Yoshino, J., & Tochinai, S. (2004). Successful reconstitution of the non-regenerating adult telencephalon by cell transplantation in *Xenopus laevis*. *Development, Growth and Differentiation*, *46*(6), 523–534. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169x.2004.00767.x>
- Yun, M. H. (2021). Salamander Insights Into Ageing and Rejuvenation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.689062>
- Zhang, J., Gao, Y., Yu, M., Wu, H., Ai, Z., Wu, Y., Liu, H., Du, J., Guo, Z., & Zhang, Y. (2015). Retinoic Acid Induces Embryonic Stem Cell Differentiation by Altering Both

Encoding RNA and microRNA Expression. *PLOS ONE*, 10(7), e0132566.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132566>

## ***XVII. ANEXOS***

### **ANEXO I. Soluciones Usadas**

#### **1. PBS 1X**

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
Agua DB	800 ml
Ajustar pH a 7.4, aforar a 1 L, y esterilizar	

#### **2. PFA 4%**

Paraformaldehído	4 g
NaOH 10N	0.6 µl
PBS 10X	10 ml
Aforar a 1 L con agua DB, y filtrar	

#### **3. Solución I Bencílicos**

Bencil benzoato	60 ml
Bencil benzol	30 ml
Guardar en oscuridad a TA	

#### **4. Solución II Bencílicos**

Metanol Absoluto	50 ml
Solución I Bencílicos	50 ml
Guardar en oscuridad a TA	

#### **5. TBE**

Tris Base	10.8 g
Ácido Bórico	5.5 g
EDTA 0.5 M	4 ml
Agua MilliQ	Aforar a 1 L

**6. Grenetina al 5%**

Grenetina en Polvo	2.5 g
$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$	0.125 g
Disolver en agua DB a 60° C	
Aforar a 500 ml	

**7. Sulfato de Cobre 1mM en Acetato de Amonio**

$\text{CuSO}_4$	1 mM
$\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$	50 mM, pH5
Preparar al momento	

**8. Sacarosa 30%**

Sacarosa	30 g
Azida de Sodio	0.02 g
Agua MilliQ	100 ml
Almacenar a 4°C	

**9. Solución de Aclaración para Inmuhistoquímica Whole Mount**

Bencil Alcohol	10 ml
Bencil Benzoato	10 ml
Almacenar a TA	

**10. 20X SSC**

NaCl	175.3 g
Citrato de Sodio	88.22 g
Ajustar pH a 7	
Aforar a 1 L	
Almacenar a TA	

**11. 2x SSC**

20X SSC	20 ml
Agua MilliQ	180 ml
Almacenar a TA	

## 12. 5X SSCT

20X SSC	10 ml
Tween 20	30 $\mu$ l
Agua MilliQ	29.970 ml
Almacenar a TA	

## ANEXO II. Anticuerpos primarios y secundarios usados

Anticuerpo	Marca	No. Catálogo	Dilución Usada
<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>			
$\alpha$ -TH Host: Conejo	Millipore	AB152	1:500 Para Inmunofluorescencias en Cortes
			1:250 Para <i>Whole Mount</i>
$\alpha$ -PCNA (FL-261) Host: Conejo	Santa Cruz Biotechnology	SC7907	1:100
$\alpha$ -SOX2 Host: Conejo	Abcam	AB97959	1:500
$\alpha$ -GFAP Host: Ratón	Millipore	MAB360	1:250
$\alpha$ -NeuN Host: Ratón	Millipore	MAB377	1:500
<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>			
$\alpha$ -IgG Conejo Conjugado a Cy3 Host: Cabra	Jackson ImmunoResearch	111-165-144	1:250

Fragmento Fab Monovalente $\alpha$ -IgG Ratón Conjugado a Alexa488	Jackson ImmunoResearch	715-547-003	1:250
Fragmento Fab Monovalente $\alpha$ -IgG Conejo Conjugado a Alexa647	Jackson ImmunoResearch	715-607-003	1:250
Fragmento Fab Monovalente $\alpha$ -IgG Ratón Conjugado a Alexa594	Jackson ImmunoResearch	715-587-003	1:250
$\alpha$ -IgG Conejo, acoplado a Peroxidasa de Rábano	Santa Cruz	SC2030	1:500

### ANEXO III. Sondas para HCR-FISH

GEN	INICIADOR	Sonda Final
Slc12a2 (Vmat2).1	B1	gAggAgggCAgCAAACggAATCCTGCCCGTGAACGGTAAACCCGG
Slc12a2 (Vmat2).2		CGGAGCACCCCTGAGCTTGGAGCACTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).3		gAggAgggCAgCAAACggAACATGGCCGGGCACGGGCTGTGAGTC
Slc12a2 (Vmat2).4		gAggAgggCAgCAAACggAACATGGCCGGGCACGGGCTGTGAGTC
Slc12a2 (Vmat2).5		gAggAgggCAgCAAACggAATGAGCCGGCGGACTGCCGGCCCTC
Slc12a2 (Vmat2).6		GCAGGGCGATGTAGACGATGAGAAGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).7		gAggAgggCAgCAAACggAACTACGGTGTAGTATGATGTTATCCAG
Slc12a2 (Vmat2).8		ACAGGTAGCTGGGAATGATGGGCACTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).9		gAggAgggCAgCAAACggAATCTCATTGATCTCGTGCGTCATGCT
Slc12a2 (Vmat2).10		CGGCCGGCCTCGGCGTCTGGAGCACTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).11		gAggAgggCAgCAAACggAATGATGGTGGCAGTCATGGCAGCTTC
Slc12a2 (Vmat2).12		AATAGGAGTATATGCTTTGGAAGTTTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).13		gAggAgggCAgCAAACggAATCCGGTTGCAAAGGTTGAGTTGTC
Slc12a2 (Vmat2).14		CTCTCAACGTCATCTCCTCTGTGACTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).15		gAggAgggCAgCAAACggAAATTCGGGGTTGGTGGCCGGCTGGGG
Slc12a2 (Vmat2).16		GGGGCAGTCAGATGGAACACTGGTGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).17		gAggAgggCAgCAAACggAATTCATTAGTATGATCAGAAATCCGCC
Slc12a2 (Vmat2).18		GGCAAACAATAGCCCCACGCGGACATAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).19		gAggAgggCAgCAAACggAAGGTGAGGAGCTGGACGGTGGCCTTC
Slc12a2 (Vmat2).20		GTTGGTTAGCGCCCTATGAAGGGATAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).21		gAggAgggCAgCAAACggAAAAACATTGGAAGCTGGTAGCCAACC
Slc12a2 (Vmat2).22		CGACAGGAACATGATGCAGAAGCCGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).23		gAggAgggCAgCAAACggAAGCTCCGGAGAAGGCAAACATGATG
Slc12a2 (Vmat2).24		GGAGCGGGCAACGAAAAGCAAGGTGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg



Slc12a2 (Vmat2).25		gAggAgggCAgCAAACggAAGGAGCAGGAAGACCCACGCCCTGT
Slc12a2 (Vmat2).26		AGCCAGCATTCCCATGCCTGCCACATAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).27		gAggAgggCAgCAAACggAATCTCTCCTCGTCGTCCTGTAGACA
Slc12a2 (Vmat2).28		GCCCAGCGGATCCCCATGGCGTTGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).29		gAggAgggCAgCAAACggAAGCCCATAATACTCCCATGGCGAGG
Slc12a2 (Vmat2).30		TTCGTACATCACACTCCAAACGGGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).31		gAggAgggCAgCAAACggAAAAGAAACGGGGCAGATTTGCCGACA
Slc12a2 (Vmat2).32		ATCCAAAAGCGCCATAGCCGCTAGATAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).33		gAggAgggCAgCAAACggAACTGCAGTATGAACAGCTGCAGAGCT
Slc12a2 (Vmat2).34		CTGACTCTTGCTGGACTCGGGATTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).35		gAggAgggCAgCAAACggAAGTCCTTCATCAGAGACAGCAAGGGG
Slc12a2 (Vmat2).36		GGATCCCGTGCAATGAGGATGTAGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Slc12a2 (Vmat2).37		gAggAgggCAgCAAACggAAGGCGATTGCCATGTTGCCAAAGCAT
Nr4a2 (Nurr1).1		CCTCgTAAATCCTCATCAAATCTGCACCACATCGGAATAAGCTC
Nr4a2 (Nurr1).2		GAGACACATGCCACCTGTAATATAGAAATCATCCAgTAAACCgC
Nr4a2 (Nurr1).3		CCTCgTAAATCCTCATCAAACCGAGCATAGCAGCATACGCAGCC
Nr4a2 (Nurr1).4		TATAGCTGCACCTGTGTGTGTGACGAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).5		CCTCgTAAATCCTCATCAAACCACACGGCAGGTTTATTCCGAGAG
Nr4a2 (Nurr1).6		ATTTGGAGGCGGTTGGGTCCGTAGAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).7		CCTCgTAAATCCTCATCAAATGGCTTTTCTCCCTCTAACTCCTC
Nr4a2 (Nurr1).8		TCTTGCCTGCCAGTCTCGCGGCTGCAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).9		CCTCgTAAATCCTCATCAAACCACTCCTCTGCTGAGTGCCTCTGC
Nr4a2 (Nurr1).10		GTGCGAAACTTCACGTTGGGCTGCCAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).11		CCTCgTAAATCCTCATCAAATCTGCAGGCGGCTCGCGAAACCAC
Nr4a2 (Nurr1).12		CAGGTGCAGTTACAGCAGGCGAGCGAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).13		CCTCgTAAATCCTCATCAAATCCAGCCTGTCTTGCCAGGTACCT
Nr4a2 (Nurr1).14		GAAGCGAGACTTGCCAGTCAGCGGAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).15		CCTCgTAAATCCTCATCAAATGAATGTGGACAGTGTGTGAATC
Nr4a2 (Nurr1).16		GCCGAGTCACGGGAGTCTCGGAAAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).17		CCTCgTAAATCCTCATCAAATGAGCCTGAACACAGGGCATGGCTT
Nr4a2 (Nurr1).18		CTGGCTCCCGAGGCGACGCCATAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).20		CCTCgTAAATCCTCATCAAATGGTAGCTGTAGCTCTGCGACGCGG
Nr4a2 (Nurr1).21		AAGTCGAGCTGTACTCGGCCGCGAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).22		CCTCgTAAATCCTCATCAAATTAACCTTGACGAACCTCGGGCGTCA
Nr4a2 (Nurr1).23		GTCATCTCCGTGTTGGTCAGGTCCAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).24		CCTCgTAAATCCTCATCAAATGAAGCTGGGCAGCGAGCTGGCGG
Nr4a2 (Nurr1).25		GCGGCGCTGTAGCTGTCCATGAAGGAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).26		CCTCgTAAATCCTCATCAAAGGCAGGGCGGCTTGACGTCGTAGC
Nr4a2 (Nurr1).27		TTGATGGAGCCTGCGGCATCTGGTAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).28		CCTCgTAAATCCTCATCAAATAGCCGTGCATCTGCAGGTCCTCCA
Nr4a2 (Nurr1).29		GGCGGCGGGTGGTGGCCGTGCTGCTAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).30		CCTCgTAAATCCTCATCAAATGCCGGGAAAGCCGGGCCCGGCT
Nr4a2 (Nurr1).31		GGCTCGTCCACAGGGCGCCGCGTAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).32		CCTCgTAAATCCTCATCAAACCTGGTGAAGCCGTGCAGCGGGC
Nr4a2 (Nurr1).33		ATCATGTGCGCCGCCGCGCGCTAAATCATCCAgTAAACCgCC

B2

Nr4a2 (Nurr1).34		CCTCgTAAATCCTCATCAAAGAGAGCCGGGGCGCCTTGCGCGGCT
Nr4a2 (Nurr1).35		GGCGGGGACTGCTTGAAGGAGAAGAAAATCATCCAgTAAACCgCC
Nr4a2 (Nurr1).36		CCTCgTAAATCCTCATCAAAGCGCATCTGGCAACTGGAGACGGGG
Nr4a2 (Nurr1).37		CATGGGCACGTGCAGGGGCCCGTCGAAATCATCCAgTAAACCgCC
Foxa2.1	B1	gAggAgggCAgCAAACggAATTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTT
Foxa2.2		CATCACGACAAAATCACCTTCCTTTTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.3		gAggAgggCAgCAAACggAACAGCAACGATCTAGCCTGCATGAAG
Foxa2.4		CGAGTGATAGAGCCAACAGACGCCATAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.5		gAggAgggCAgCAAACggAAAACATGTAAAACAGCAGACACGGGT
Foxa2.6		AACTTGGGTTTCACTGCTGGGCTCCTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.7		gAggAgggCAgCAAACggAAAGAGAGGGCCACGCTCGGCCCTTGC
Foxa2.8		ACTAAAGCAAATATAGCCACAATCGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.9		gAggAgggCAgCAAACggAACAGCCTCGGCACATGCAGCATTTCa
Foxa2.10		TCTCCTTCTCCAAGTTATACCAGCTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.11		gAggAgggCAgCAAACggAAGACCACTCAAGGACTAGCTTGTTTT
Foxa2.12		AGCGCCCAGTGCTCAGGCAAGTTGCTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.13		gAggAgggCAgCAAACggAAATTAATTGTGTCAGACCTCGAAAA
Foxa2.14		GCCATTTCAAATATATGTCGTCCTATAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.15		gAggAgggCAgCAAACggAAGTCCATTCTTTCCAAGCTATATCCC
Foxa2.16		TGTTTCTTCTTTTGTAGCCTTTCTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.17		gAggAgggCAgCAAACggAATGTCACGGTGTCACTCCTGCTCTGG
Foxa2.18		ACTTGCTGCAATTGCTGTCCGTAGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.19		gAggAgggCAgCAAACggAAGGAGTGTGCAGCTAGGTGCTGCCGG
Foxa2.20		CGTGTGTCGAACTAGCATCATCAGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.21		gAggAgggCAgCAAACggAACCACTAGTACTCAGAGTATTGGCAA
Foxa2.22		CACTGGTACTCGGATTCTGGAAGTTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.23		gAggAgggCAgCAAACggAAACTGGTATTCAGAGTTTTCCAATTG
Foxa2.24		ACGGTACTCGAGTCTGAAAGTACTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.25		gAggAgggCAgCAAACggAAAAAGAACCCACTGCTACTCGAGTAC
Foxa2.26		AAGTACCAGCTGGTAGTCAGAGATGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.27		gAggAgggCAgCAAACggAAAGTATCCACTGGTACCCGTAGTCTT
Foxa2.28		GTACCCACAGGTTCTCGGAGTCTGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.29		gAggAgggCAgCAAACggAATACCTACCGTACTCGGAGTTCTGA
Foxa2.30		ACCCACTGGTATTCCGAGTCTGAATAgAAgAgTCTTCCTTTACg
Foxa2.31		gAggAgggCAgCAAACggAAAACATTGGTACTCGTAGTCTTGAAA
Foxa2.32	CCACTGCTACTCGGAGTTTTGAAAGTAgAAgAgTCTTCCTTTACg	
Foxa2.33	gAggAgggCAgCAAACggAACCCCTGGAATTCGGAGTCATGAAAGT	
Foxa2.34	ACTGGTACTCAGTGTCTTTAAAGTATAgAAgAgTCTTCCTTTACg	
Foxa2.35	gAggAgggCAgCAAACggAACTGATACTGACTCACATGACAATGT	
Foxa2.36	TGGCATGTGCTGTCTTGGCAGTGCCTAgAAgAgTCTTCCTTTACg	
Foxa2.37	gAggAgggCAgCAAACggAAGGTAGTAGGGGTGTAGGCAGTTACC	
Lmx1a.1		CTCACTCCCAATCTCTATAAACCGCACTTACAGGCAAAACAACCTG
Lmx1a.2		GCTGGGCGCGATCACCTCCAAGCAGAACTACCCTACAATCCAAT
Lmx1a.3		CTCACTCCCAATCTCTATAAGCTCTTTTGTGCCCGCATGACAAC
Lmx1a.4		GCAGCAGAAGCAGGCCACGTGGTACAACCTACCCTACAATCCAAT

Lmx1a.5	B5	CTCACTCCCAATCTCTATAAATTCTGCAGCTGCCGCTCGCACACG
Lmx1a.6		TCCCTCCTTCAGCACAAATTCATCGAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.7		CTCACTCCCAATCTCTATAATTGTAATCACCTCTGCACAGCAGC
Lmx1a.8		CACCAGGCTCAGCAGCTCGCGTTCCAACCTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.9		CTCACTCCCAATCTCTATAAATTTGCCTGAATCCGATCCAGCGGGG
Lmx1a.10		CTTGCAAATGCTTCTCACCATCGAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.11		CTCACTCCCAATCTCTATAAACTTCCTTTGCCATTCTCAAGCCCT
Lmx1a.12		TTTTGGGCGCTTGTGGTCCTTATCAAACCTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.13		CTCACTCCCAATCTCTATAAATTGTGTAGTTAGTATTGTTCTCGGC
Lmx1a.14		AAATGAAGCTTTGAAGGCCCTCCTCAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.15		CTCACTCCCAATCTCTATAAATTTCTGCATGGTTTGGCAGATACT
Lmx1a.16		CGTCTCAGCAGCTAACGTTTCACGAAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.17		CTCACTCCCAATCTCTATAAAACTTGAACCACTCGCACACTGAGC
Lmx1a.18		CATCTTAGCTCTTTGATTCTGGAACAACCTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.19		CTCACTCCCAATCTCTATAAATTGTTGTTGTCGCCTTGAAGTTTC
Lmx1a.20		CTGAGGGTTTTGCTGATCCTGCTGCAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.21		CTCACTCCCAATCTCTATAAGCCACTTGACGGAGCTGAACTGAGC
Lmx1a.22		CATGATGGCGTCCATGCTCGAGCTGAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.23		CTCACTCCCAATCTCTATAAATTGCTGAGGCAGTGACGTATAAGTA
Lmx1a.24		CATATTCTGCTCAATCACCAGGAGCAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.25		CTCACTCCCAATCTCTATAAATCCTTGTGCGAAAGGGATCGGAGTTG
Lmx1a.26		GTCTCCTGGCATTGTGGTGGGGTGAACCTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.27		CTCACTCCCAATCTCTATAACGTCTCATTGCCGTAAGGGTGCATG
Lmx1a.28		GCAGTCACTATCCATATCATGGAAAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.29		CTCACTCCCAATCTCTATAAACAGTCTCCAGGTTAGCGAGCGAA
Lmx1a.30		TGAACCAATCTCGGAAGATGTCAGGAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.31		CTCACTCCCAATCTCTATAAAATTTGGGTTTCCCCTCTTCTTGT
Lmx1a.32		GGAAATTCGCATGGAGTAGAGATGAAACTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.33		CTCACTCCCAATCTCTATAACCAGAGAGGAATTCAGGAGGTGAAA
Lmx1a.34		CATTCTTTCAGATGATCAGCCAGGGAACCTACCCTACAAATCCAAT
Lmx1a.35		CTCACTCCCAATCTCTATAAAATAAATAACCATGGTCTCTAATGTC
Lmx1a.36		CTCACTCCCAATCTCTATAAAATAAATAACCATGGTCTCTAATGTC
Lmx1a.37		GGCAGCCTTCCCGCAATTGAGATGAACTACCCTACAAATCCAAT

#### ANEXO IV. Iniciadores y Hairpins usados en HCR-FISH

<b>Gen</b>	<b>Iniciador Usado</b>	<b>Hairpins Usados</b>
<i>Vmat2</i>	B1	B1h1 / B1h2 Acoplados a AlexaF 647
<i>Nurr1</i>	B2	B2h1 / B2h2 Acoplados a AlexaF 647
<i>Pitx3</i>	B2	B2h1 / B2h2 Acoplados a AlexaF 647
<i>Foxa2</i>	B1	B1h1 / B1h2 Acoplados a AlexaF 647
<i>Lmx1a</i>	B5	B5h1 / B5h2 Acoplados a AlexaF 488

## ANEXO V. Oligonucleótidos para qRT-PCR

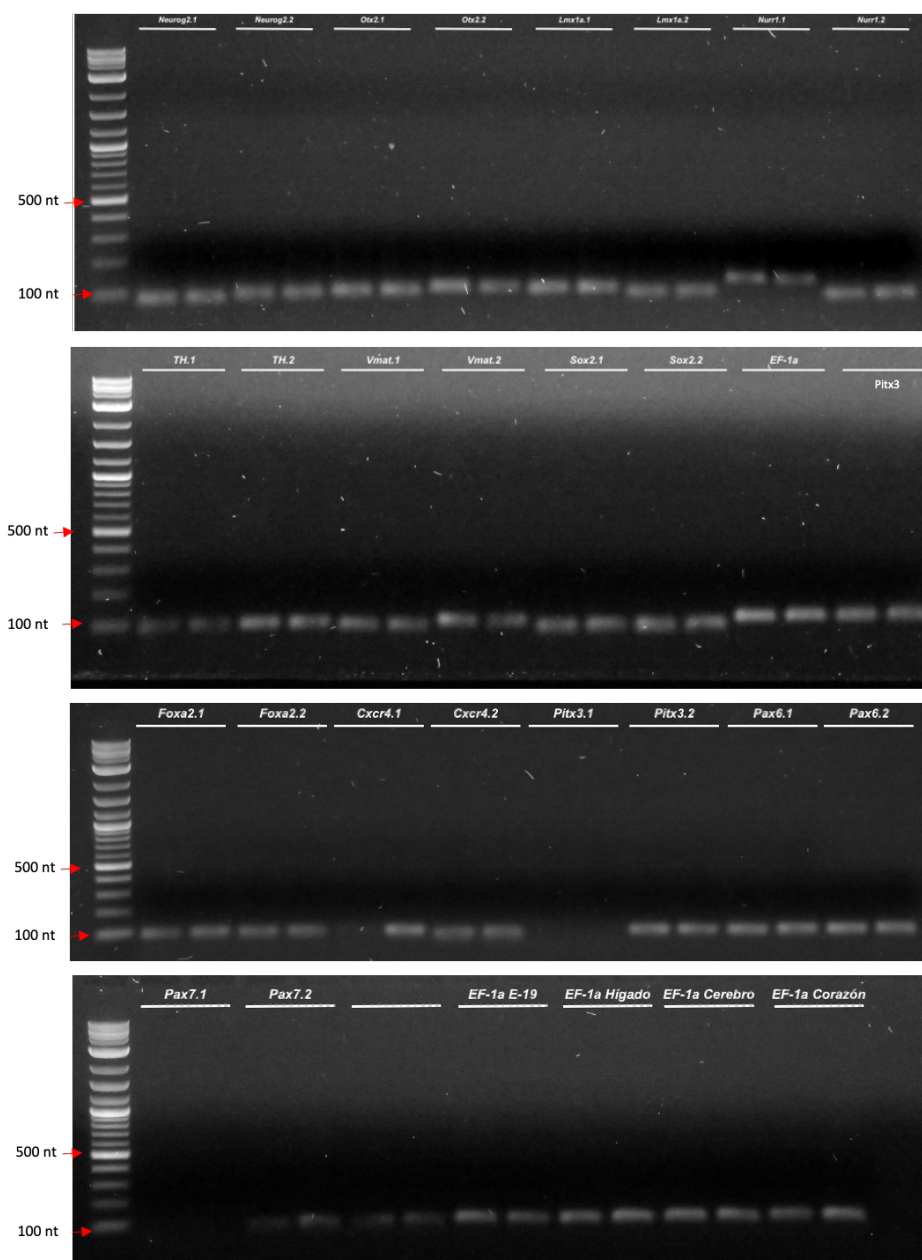
Gen	Primers	Observaciones
<b>Ax Neurog2</b>	F: GACAGGTTCCGCCAATACGA R: AACTTCGTGCTCGGTCTCTG Producto: 81	Amplificó No Seleccionado
	F: AACTACCTGTCTGACCCGA R: CTCGTGAAAGCAGTGTTGGC Producto: 81	Amplificó Seleccionado
<b>Ax Otx2</b>	F: GGAAGAGTCCGAGCGAGAAG R: AAGTCAGGCTTAGCCCGTTC Producto: 138	Amplificó Seleccionado
	F: ATAAAGACCAGGCCGCATCC R: GCAGACCACATACCCCAA Producto: 120	Amplificó No Seleccionado
<b>Ax Lmx1b</b>	F: CCAGGAAGAAGACACCCACC R: AAGAGCTGATGAGCACCCAC Producto: 143	Amplificó No Seleccionado
	F: GGACAGCCAACTCAAGGGAA R: GCAGGGTTTGGAGGACACTT Producto: 132	Amplificó Seleccionado
<b>Ax Lmx1a</b>	F: GTCATGCGGGCACAAAAGAG R: AGCTCGCGTTCCTTTTCGTA Producto: 143	Amplificó Seleccionado
	F: ATGCACCCTTACGGCAATGA R: ACAGTCTCCAGGTTAGCGA Producto: 78	Amplificó No Seleccionado

<b>Ax Foxa2</b>	F: GAGGACATGAGGTTGTTGATGGA R: TCTCGCACGAGGCC Producto: 88	Amplificó Seleccionado
	F: ACTGGTAGATCTCGCTCAGC R: CGCCCTACTCCTACATCTCG Producto: 84	Amplificó No Seleccionado
<b>Ax Cxcr4</b>	F: CGCATTCAAAGGCCAACAA R: ATCACGCCAGCAGAATGAA Producto: 130	Amplificó No Seleccionado
	F: ACCATGACCGACAAGTACCG R: AGAAGGGCAGTGTGAAGACG Producto: 70	Amplificó Seleccionado
<b>Ax Nurr1</b>	F: AGAGAGAAGATCGCCCCCTT R: TAGCGGGTCCTTCCCTTACA Producto: 125	Amplificó No Seleccionado
	F: CCCGCTTCACCCTAAGAGAC R: ATGGCAGGTCTGAAAGCTCC Producto: 131	Amplificó Seleccionado
<b>Ax Pitx3</b>	F: ACTCGTACAACAACACTGGGCG R: GGGCTGACGTTTCATGGAGTT Producto: 91	No Amplificó
	F: GGGGTCCTTTCAGGTCACAG R: GCCGGGACTTAAAAGGTGGT Producto: 89	Amplificó Seleccionado
<b>Ax TH</b>	F: TGCGAGGATCTCAGAAGCAC R: GTCCAAATCCATGTCCGGGT Producto: 117	Amplificó No Seleccionado
	F: GAGGACGTCTCGCGCTTTAT R: AAGCTGGACAGGAAGTCACG Producto: 92	Amplificó Seleccionado

<b>Ax Vmat2</b>	F: ACATCTCATCACGCAAGGGG R: AGCGCTTTGGTTTCGTTGAC Producto: 85	Amplificó Seleccionado
	F: GCCACCAGTGTTCCATCTGA R: TGTTGGTTAGCGGCCCTATG Producto: 136	Amplificó No Seleccionado
<b>Ax Sox2</b>	F: CATGTCCGAGCACTACCAGA R: GAAGAGGGTTGGCGAGAGTC Producto: 123	Amplificó No Seleccionado
	F: AACTCCATGAATCCCTCCGC R: GATTCGGACTTGACCACCGA Producto: 137	Amplificó Seleccionado
<b>Ax Pax6</b>	F: GACAGAGGTCAGGCTTTGCT R: ACCTATGCTGATTGGCGAGG Producto: 119	Amplificó No Seleccionado
	F: CCACTCCGCATTTCAAGACT R: GCTGGTTCCTCCGCTATGA Producto: 92	Amplificó Seleccionado
<b>Ax Pax7</b>	F: TCCCAAGAACTCTGCACGTC R: AGGCAAAAGAAGAGTCCCCG Producto: 88	No Amplificó
	F: AGAGCAAGGTGGCGTAAACA R: ACTTGCATAGCCGGAGTCTG Producto: 132	Amplificó Seleccionado

## ANEXO VI. Prueba de Oligonucleótidos en cDNA control

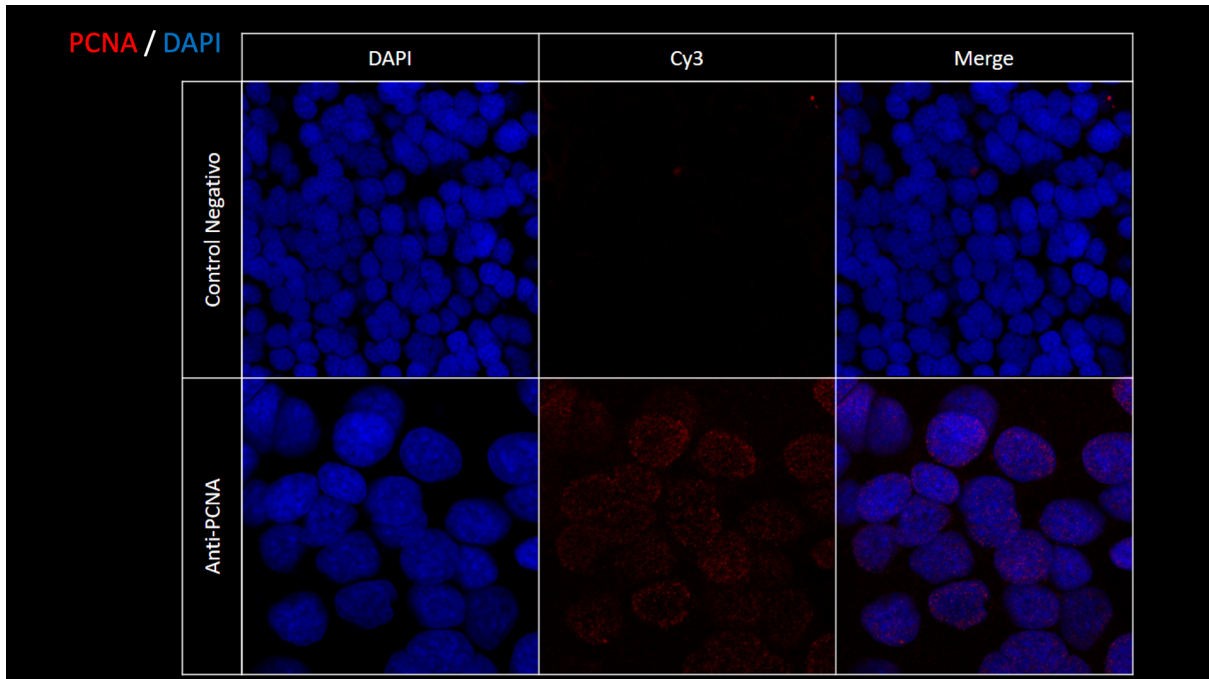
Para probar los oligos diseñados, se realizaron qPCRs con cDNA proveniente de varios tejidos controles de ajolotes adultos, o embrionarios. Estos controles variaron según los reportes de la expresión de los genes identificados por microarreglos (Nowoshilow et al., 2018).



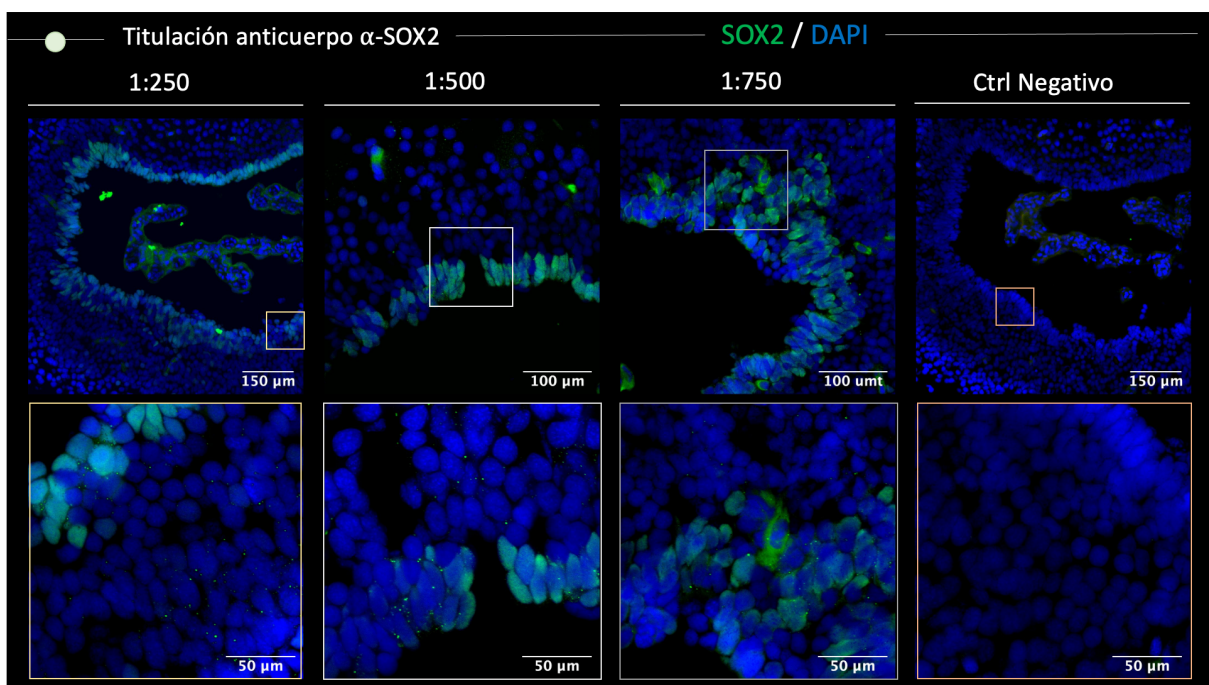
**Figura 23. Prueba de Oligonucleótidos en cDNA control.** RT-qPCRs de diferentes cDNA de ajolote: Embrión Etapa-19, Hígado, Cerebro, y Corazón. Se muestran los geles con los amplicones correspondientes para cada par de oligos. Se observa que utilizando los oligos diseñados se obtiene un solo producto del tamaño esperado. Como control de expresión se usó el gen housekeeping *EF-1 $\alpha$* .



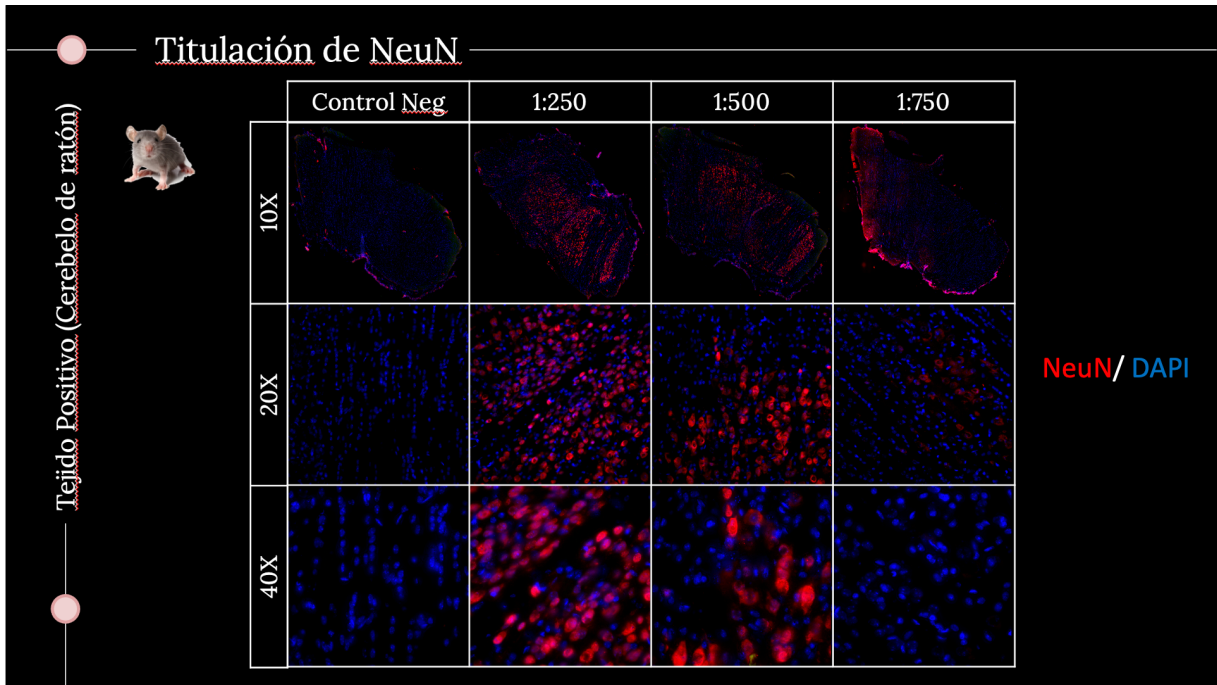
## ANEXO VII. Titulación de Anticuerpos en cerebro de ajolote



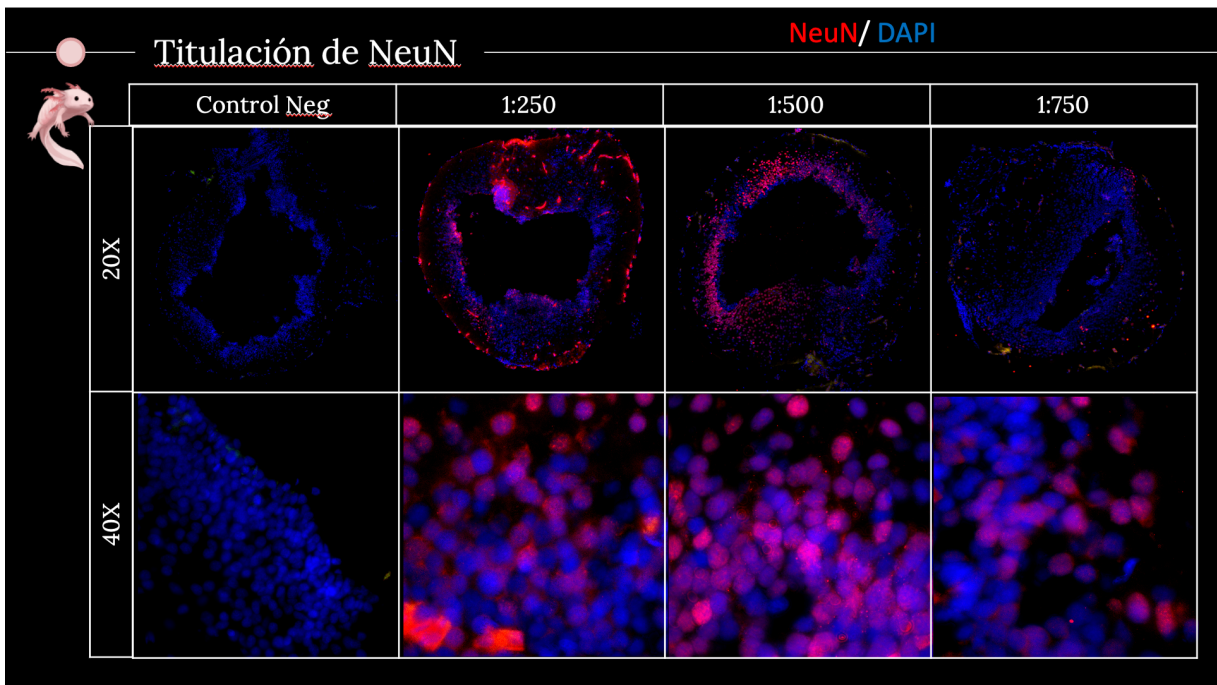
Prueba de Anticuerpo  $\alpha$ -PCNA en cerebro de ajolote



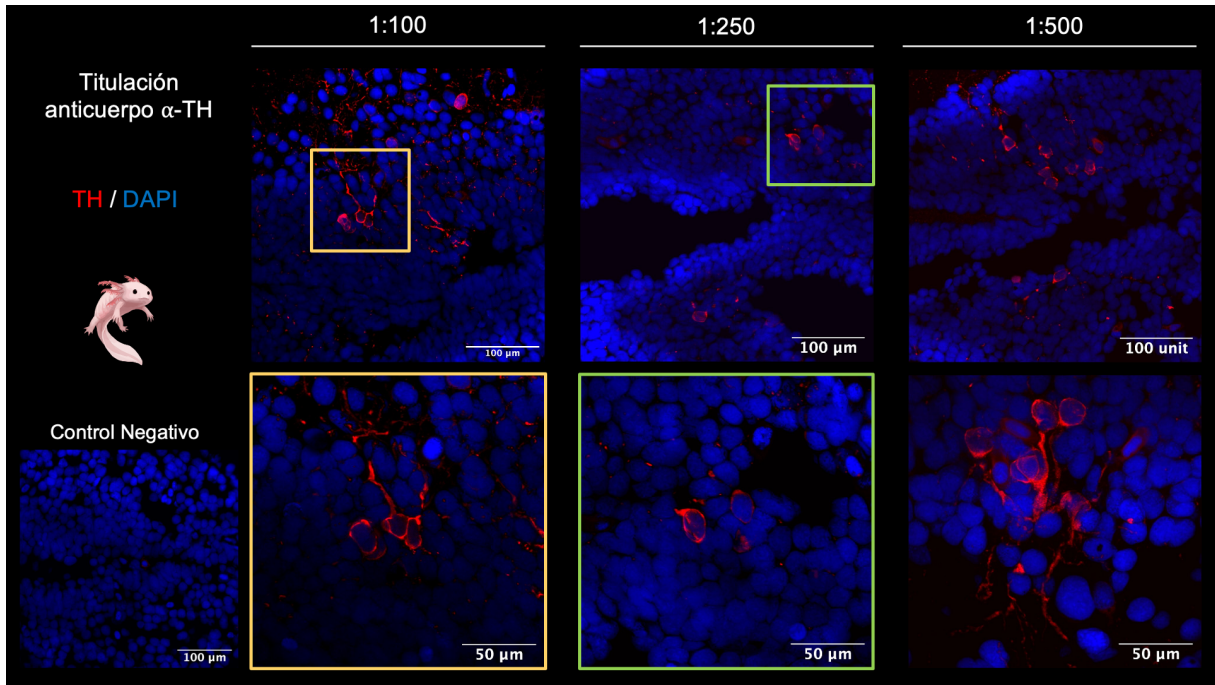
Prueba de Anticuerpo  $\alpha$ -SOX2 en cerebro de ajolote



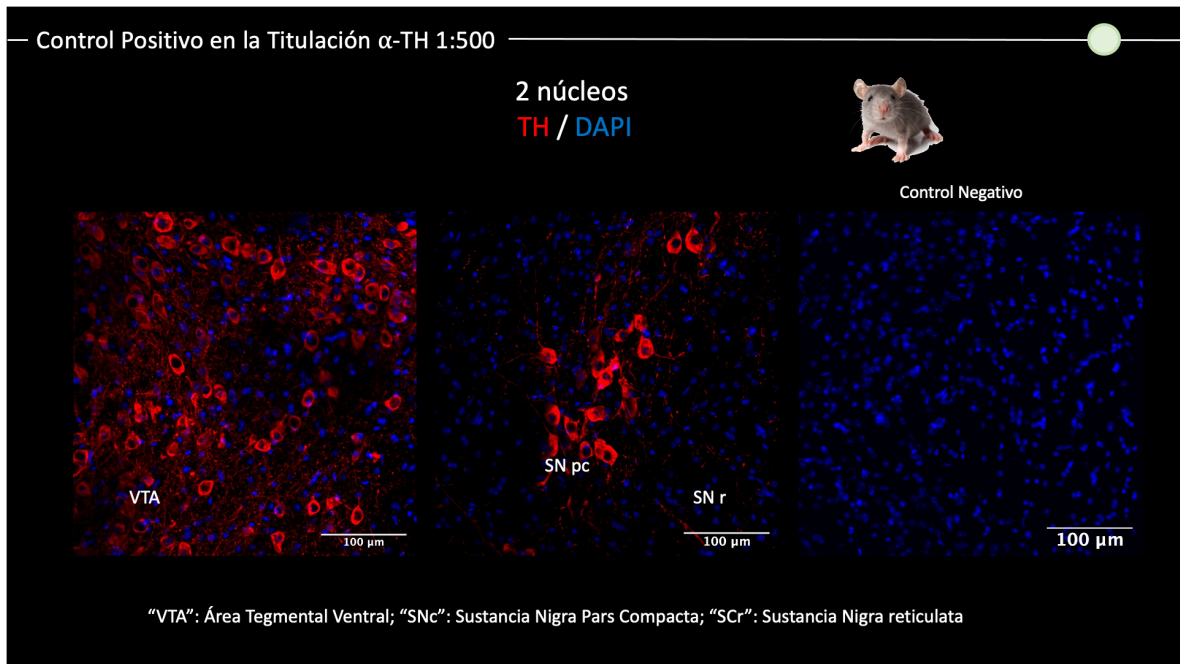
Prueba de Anticuerpo  $\alpha$ -NeuN en cerebelo de ratón CD1



Prueba de Anticuerpo  $\alpha$ -NeuN en cerebro de ajolote

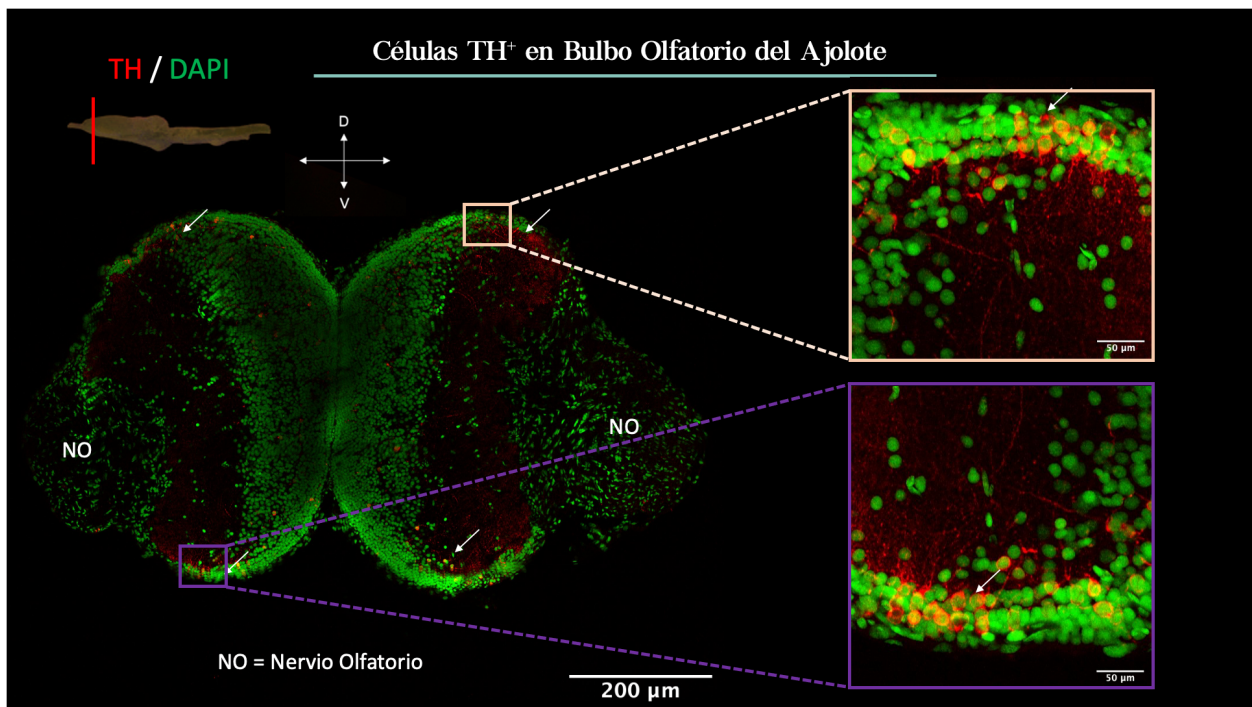


Prueba de Anticuerpo  $\alpha$ -TH en cerebro de ajolote

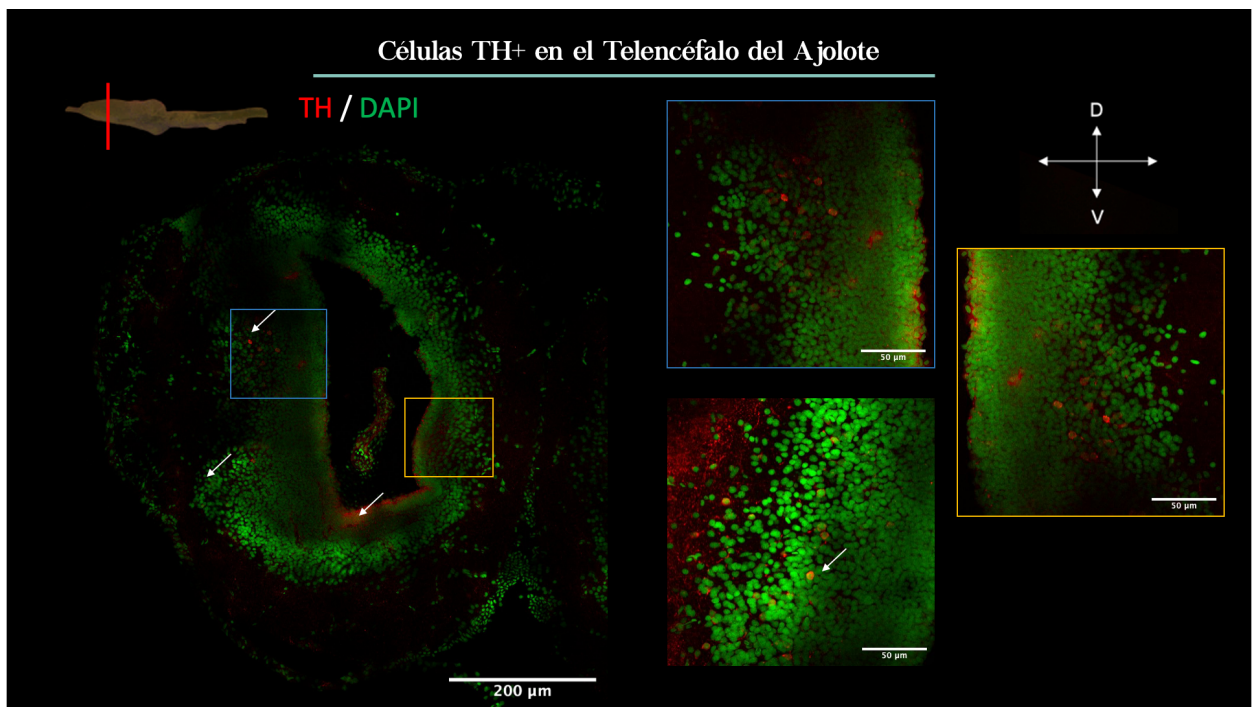


Prueba de Anticuerpo  $\alpha$ -TH en Mesencéfalo de Ratón

## ANEXO VIII. Detección de Neuronas TH<sup>+</sup> en Bulbos Olfatorios y Telencéfalo del ajolote.



Neuronas TH<sup>+</sup> en el Bulbo Olfatorio del ajolote



Neuronas TH<sup>+</sup> en el Telencéfalo del ajolote