



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

Expresión del gen Fz7 durante la regeneración de médula espinal en adultos de pez cebra por RT-PCR

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO
DE LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JENNIFER ALEJANDRA AGUILAR LÓPEZ

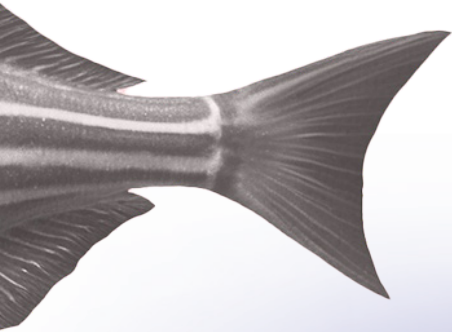


COMITÉ DE TUTORES

ASESORA PhD. CARLA GARCÍA MORALES

COASESORA PhD. MARÍA DE LOURDES RUÍZ GÓMEZ

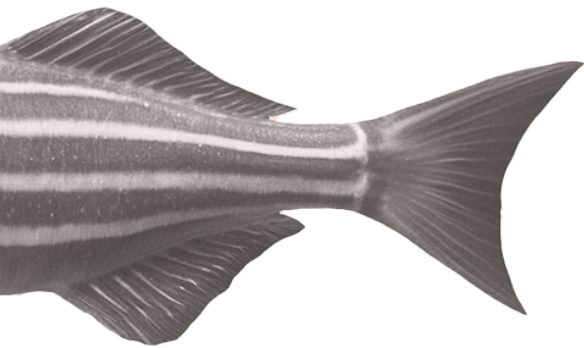
El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, noviembre de 2024.



**“Expresión del gen Fz7
durante la regeneración de
médula espinal en adultos de
pez cebra por RT-PCR”**

Jennifer Alejandra Aguilar López





Introducción p 14

- 1.1 SNC y médula espinal en mamíferos p 15
- 1.1.2 Función de la médula espinal p 15
- 1.1.3 Materia gris p 15
- 1.1.4 Materia blanca p16

Afectaciones de la médula espinal de mamíferos que afectan su función p 18

Antecedentes p 21

- 3.1 Generalidades de la regeneración p22
 - 3.1.1 Formación de cicatrices en mamíferos después de una LME p23
 - 3.1.2 Regeneración evaluada en el laboratorio p23
 - 3.1.3 El pez cebra como modelo de regeneración p24
- 3.2 Vías de señalización p26
 - 3.2.1 Proteínas Wingless p27
 - 3.2.2 Genes frizzled p27
 - 3.2.3 Fzd en el pez cebra p28
 - 3.2.4 Fz7a y Fz7b p28
- 3.3 Vías canónicas y no canónicas p29
 - 3.3.1 Vía canónica p29
 - 3.3.2 Vía Wnt/B catenina en la regeneración de médula p31

- 3.3.3 Vías no canónicas p32
- 3.3.4 Vía PCP p32
- 3.3.5 Vía del calcio p34
- 3.4 Genes presentes en el estudio p35
 - 3.4.1 B-catenina p35
 - 3.4.2 Fz7b p35

1

2

3

4

Justificación p 37

5

Objetivos p38

- 5.1 Objetivo general p39
- 5.2 Objetivos específicos p39

6

Método p40

- 6.1 Cuidados y mantenimiento de la colonia p41
- 6.2 Elección de genes en base de datos p41
- 6.3 LME en pez cebra adulto p41
- 6.4 Extracción de ARN p43
- 6.5 Síntesis de ADNc p45
- 6.6 RT-PCR p45
- 6.7 Electroforesis p46

Resultados y discusión p47

7.1 Expresión de genes en pez cebra **p48**

7.2 Obtención de oligonucleótidos **p49**

7.2.1 Determinación del tamaño de aplicón **p50**

7.2.2 Expresión de fz7 en tejidos de pez cebra **p51**

7.3 LME en pez cebra **p54**

7.4 Extracción de RNA **p55**

7.5 Estandarización de RT-PCR para B-actina y fz7b **p58**

7.6 Evaluación del gen fz7b durante la regeneración de ME en pez cebra adulto **p62**

7.7 Análisis con ImageJ **p64**

7.8 Evaluación de movimiento durante la regeneración **p67**

7

8

Conclusiones p69

9

Trabajo a futuro p71

10

Anexos p73

11

Referencias p74

ÍNDICE



Listado de figuras

Figura 1: Anatomía humana del SNC y Corte transversal de médula espinal	16
Figura 2: Lesión primaria y secundaria de ME	19
Figura 3: Esquema de pez cebra adulto	25
Figura 4: Comparación de comportamiento en LME en mamíferos y pez cebra	26
Figura 5: Vía de señalización canónica β -catenina	31
Figura 6: Vía de señalización no canónica Wnt/PCP	33
Figura 7: Vía de señalización no canónica Wnt/Ca ²⁺	34
Figura 8: Preparación de ejemplares para la lesión	43
Figura 9: Expresión de B-actina en diferentes sistemas y estadios del pez cebra en base de datos ZFIN	48
Figura 10: Expresión de fz7a en diferentes sistemas y estadios del pez cebra en de datos ZFIN	48
Figura 11: Expresión de fz7b en diferentes sistemas y estadios del pez cebra en de datos ZFIN	49
Figura 12: Resultado de Pimer-BLATS para tamaño de amplicón de β -actina	50
Figura 13: Resultado de Pimer-BLATS para tamaño de amplicón de fz7b	50
Figura 14: Resultado de expresión en tejidos de β -actina en Bio GPS	51
Figura 15: Resultado de expresión en tejidos de fz7b en Bio GPS	53
Figura 16: Pez cebra en agua con anestesia	54
Figura 17: Pez cebra con médula espinal seccionada después de LME	54
Figura 18: Lesión muscular de pez cebra adulto	55
Figura 19: Corte de zona de lesión y tejido pulverizado	58
Figura 20: Medición de ARN en espectrofotómetro Nanodrop 2000	57
Figura 21: Gel de agarosa para la estandarización para β -actina	59
Figura 22: Gel de electroforesis de agarosa 2% para nuevo gradiente de temperatura de 60 a 63°C para β -actina	60
Figura 23: Gel de agarosa 2% gradiente de temperatura para fz7b	61
Figura 24: Gel de electroforesis de agarosa 2% nuevo gradiente de temperatura de 55 a 62°C para la estandarización de fz7b	62
Figura 25: Panel de evaluación de expresión de fz7b después de la lesión (evaluación inicial)	63
Figura 26: Panel de evaluación de expresión de fz7b después de la lesión (repetición)	64

Listado de tablas

Tabla 1: Resumen de lesión primaria y secundaria después de LME	18
Tabla 2: Complicaciones de diferentes sistemas provocados por LME	20
Tabla 3: Cronograma de experimentación de regeneración medular en pez cebra adulto	42
Tabla 4: Master Mix para retrotranscripción con volumen de 25 μ L	45
Tabla 5: Ciclado para obtención de ADNc en la reacción de retrotranscripción	45
Tabla 6: Master Mix para reacciones de PCR	46
Tabla 7: Resultados de mediciones espectrofotométricas de muestras usadas	57
Tabla 8: Ciclado para PCR de estandarización del gen B-actina	58
Tabla 9: Ciclado para PCR de estandarización del gen fz7b con peces control	61
Tabla 10: Valores normalizados para primer ensayo con % de expresión	65
Tabla 11: Valores normalizados para repetición de ensayo con % de expresión	65

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNm: Ácido desoxirribonucleico mensajero

AG: Acetato de glutiramero

AME: Atrofia muscular espinal

APC: Gen supresor de tumores de la poliposis coli adenomatosa

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATF: Factor de transcripción

ATP: Adenosin trifosfato

BHE: Barrera hematoencefálica

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local por sus siglas en inglés

Ca²⁺: Ion de calcio

CaMKII: Proteína quinasa II dependiente de calmodulina

CK1: Caseína quinasa 1

DAGs: Diaglicéridos

DKK: Proteína dickkopf

dNTP: Desoxinucleotido trifosfato

dNTPmix: Mezcla de desoxinucleotidos trifosfato

dpl: Días post lesión

Dsh: Proteína dishevelled

EA: Espondilitis anquilosante

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

EM: Esclerosis múltiple

ESC: Células madre embrionarias por sus siglas en inglés

Fz: Frizzled

Fz7a: Frizzled 7a

Fz7b: Frizzled 7b

°C: Grados centígrados

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3

IFN- β : Interferon β

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IP3: Inositol trifosfato

K: Potasio

Kb: kilo bases

LEF: Factor estimulante linfoide

LIF: Factor inhibidor de leucocitos

LME: Lesión de médula espinal

LM: Lesión en músculo

LRP5: Proteína relacionada a receptores de lipoproteínas de baja densidad 5

LRP6: Proteína relacionada a receptores de lipoproteínas de baja densidad 6

μ g: microgramo

μ L: Microlitro

mL: Mililitro

mm: milímetro

MMLV: Virus de la leucemia murina

Na: Sodio

NFAT: Factor nuclear asociado a células T

NF κ B: Factor nuclear kappa de células B activadas

Oligo dT: Secuencia monocatenaria de desoxitimina

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés

pH: Potencial de hidrógeno

PK: Proteína prickle

PKC: Proteína quinasa C

Rac1: GTPasa 1 de la familia Rac

REL: Retículo endoplasmático liso

Rho: Factor Rho

RNA_{sin}: Inhibidor de ribonucleasas

SL: Sin lesión

SMN1: Gen de supervivencia de neurona motora

SNC: Sistema nerviosa central

TLF: Factor de células T

T_m: Temperatura de alineación

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TSD: Duplicación del genoma específico de teleósteos por sus siglas en inglés

Vangl: Proteína Van Gogh

Wnt: Wingless

xg: Fuerza centrífuga relativa

ZFIN: Red de información del pez cebra por sus siglas en inglés

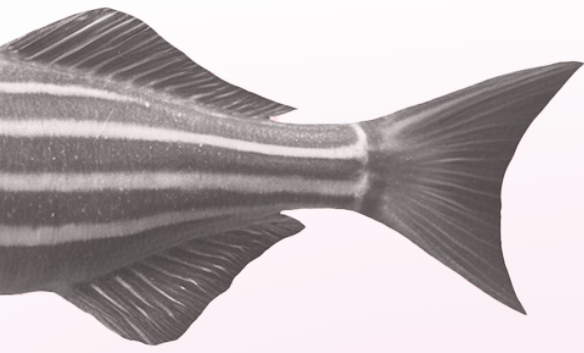
Resumen

La médula espinal es la parte del sistema nervioso central que, junto con el cerebro, actúan como centro receptor para todos los estímulos exteriores, que se traducen en información y a su vez generan una respuesta. Este sistema hace posible la percepción y entendimiento del medio que nos rodea, así como la propiocepción dentro del organismo. Cuando existe una lesión de médula espinal a causa de un accidente o por alguna enfermedad, existe un daño directo a esta vía de información que impide una buena calidad de vida a las personas siendo una condición que afecta de forma personal y colectiva. Actualmente existen diferentes tratamientos con el único objetivo de mitigar los daños provocados por la lesión; sin embargo, esto no garantiza una recuperación de las funciones de la médula espinal. Por lo anterior, es importante fortalecer la investigación científica que brinde información acerca de los procesos de regeneración con enfoque en moléculas, mecanismos o genes que den paso a la creación de dianas terapéuticas. Para ello, es necesario el uso de modelos animales, que, con ayuda de herramientas como la biología molecular, permitan estudiar el sitio de la lesión, así como los procesos que llevan a una recuperación de la función. Es por ello por lo que en el presente trabajo se propone el estudio de *frizzled 7*, un gen reportado por su papel en la inducción de neurogénesis y reconexión axonal en especies como *Xenopus laevis* y *Danio rerio*, con el fin de poder generar conocimiento que aporte a futuro al área de investigación de medicina regenerativa.

Para la evaluación de la expresión del gen *frizzled 7*, se lesionó la médula espinal de peces cebra adultos y después de el periodo establecido de acuerdo con la literatura, se sacrificaron los ejemplares y se evaluó por medio de RT-PCR la expresión del gen en cuatro diferente momentos tras el daño inicial. De lo anterior, se obtuvo una diferencia en el patrón de expresión, lo que sugiere que *frizzled 7* sí contribuye a la regeneración de la médula espinal en peces cebra adultos.

Palabras clave: ***médula espinal, regeneración, biología molecular.***





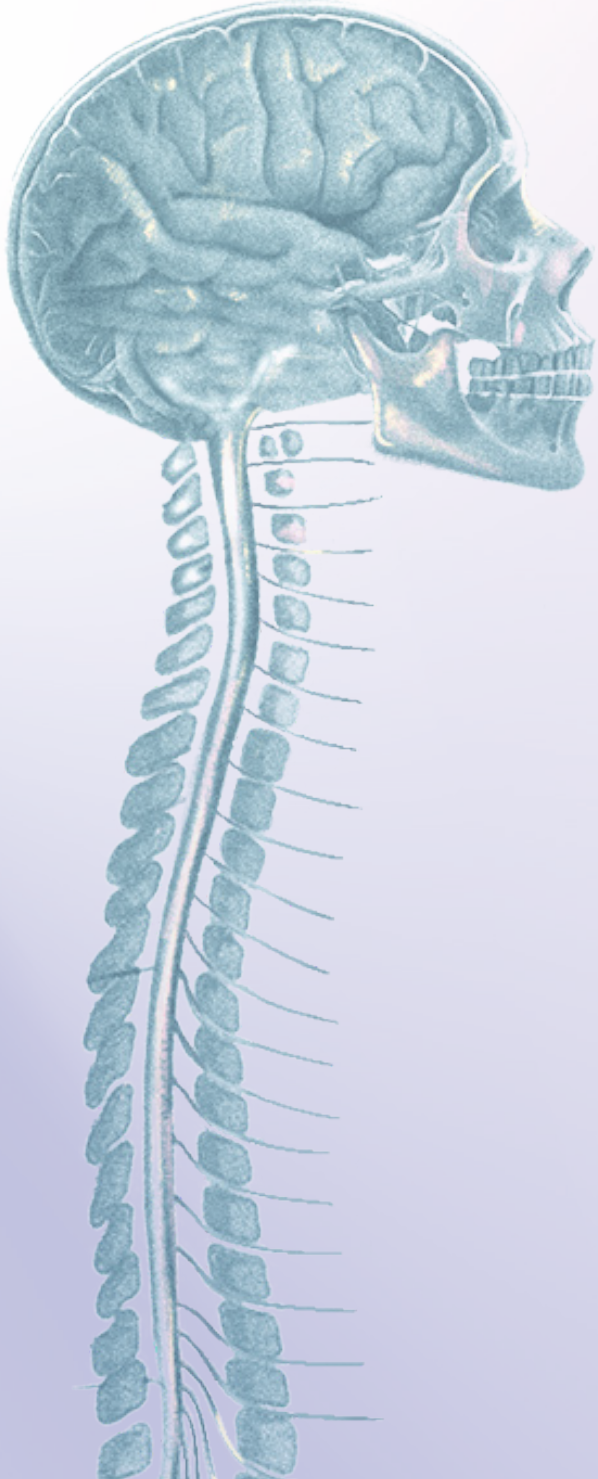
Abstract

The spinal cord and the brain are parts of the central nervous system in charge of receiving all external stimuli, which are then translated into information that generates a response in the individual. This system helps to perceive and understand the surrounding environment, and it is also in charge of the proprioception inside the organism. When a spinal cord lesion occurs after an accident or due to disease, the direct damage to the information pathway translates into a poor quality of life, affecting not only the person who suffers it, but also to the people around them. There are different treatments, mainly focused on the mitigation of the damage produced by the lesion; however, they may not aid the recovery of the spinal cord function. Therefore, it is important to strengthen the scientific research into the understanding of the regenerative processes, which can be focused on molecules, mechanisms or genes that will eventually help to create therapeutic targets. Model animals, together with molecular biology studies can study the lesion site and the processes behind the recovery of the spinal cord function. Therefore, this study used *frizzled 7*, a gene involved in neurogenesis and axon reconnection in *Xenopus laevis* and *Danio rerio*, to provide information that may aid future research in regenerative medicine.

To evaluate the expression of *frizzled 7*, we induced spinal cord lesions in adult zebrafish. After an established period, the fish were euthanized and using RT-PCR we evaluated the expression of the gene in four different time points.

We found differences in the expression pattern, suggesting that *frizzled 7* plays a role in the spinal cord regeneration in adult zebrafish.

Keywords: ***spinal cord, regeneration, molecular biology***



I Introducción.

1.1 Sistema nervioso central y médula espinal

En vertebrados, incluido el hombre, el sistema nervioso central (SNC) es cerebro-espinal debido a que lo compone el encéfalo y la médula espinal, ambas estructuras convergen para formar ramificaciones nerviosas que llegan a diferentes puntos a lo largo de la médula. En mamíferos el sistema nervioso se origina a partir del ectodermo (capa germinal presente en el desarrollo embrionario) (*Orestes Cendreno, 1966*).

La médula espinal se encuentra contenida por un canal espinal, protegido por estructuras óseas llamadas vertebras. Se integra por 31 segmentos: 8 son cervicales, 12 torácicos o también llamados dorsales, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coccígeo (*figura 1*), cada uno tiene un par de raíces: dorsal y ventral y un par de nervios espinales, con excepción del primer segmento cervical (*figura 2*) (*Ponz & Barber, 1993*).

1.1.2 Función de la médula espinal

Las funciones principales de la médula espinal son tres: enviar comandos motores del cerebro al cuerpo, transportar la información sensorial que el cuerpo percibe del exterior al cerebro y coordinar los reflejos, para proporcionar el movimiento necesario en la vida de un individuo (*Thau et al., 2022*)

Dicho de otra forma, la médula espinal es el conducto de percepción de información y respuesta entre el cerebro y el resto del cuerpo, esto es posible por el intercambio de señales motoras desde la corteza motora a los músculos e información sensorial desde las fibras aferentes a la corteza sensorial, este proceso ocurre bidireccionalmente. En ciertos casos, la médula espinal puede coordinar de forma independiente los reflejos, o lo que conocemos como arco reflejo, este tipo de movimiento permite que el cuerpo responda a la información sensorial sin esperar la respuesta del cerebro (*Derderian et al., 2023; Thau et al., 2022*).

1.1.3 Sustancia Gris

La sustancia gris de la médula espinal forma una estructura en forma de H cuando se observa en un corte transversal, está compuesta de somas (*ver glosario*), células gliales y dendritas, se conecta por un canal central que está revestido con epitelio cilíndrico ciliado y lleno de líquido cefalorraquídeo (*figura 2*).

La proporción de sustancia gris y blanca varía en los diferentes niveles de la médula espinal (Bican et al., 2013).

1.1.4 Sustancia blanca

La materia blanca está organizada en tractos. Los tractos ascendentes llevan información de los receptores sensoriales a niveles más altos del SNC, mientras que los tractos descendentes llevan información del SNC a la periferia. No contiene cuerpos celulares neuronales y está formada en su gran mayoría por axones mielinizados y oligodendrocitos.

(Bican et al., 2013).

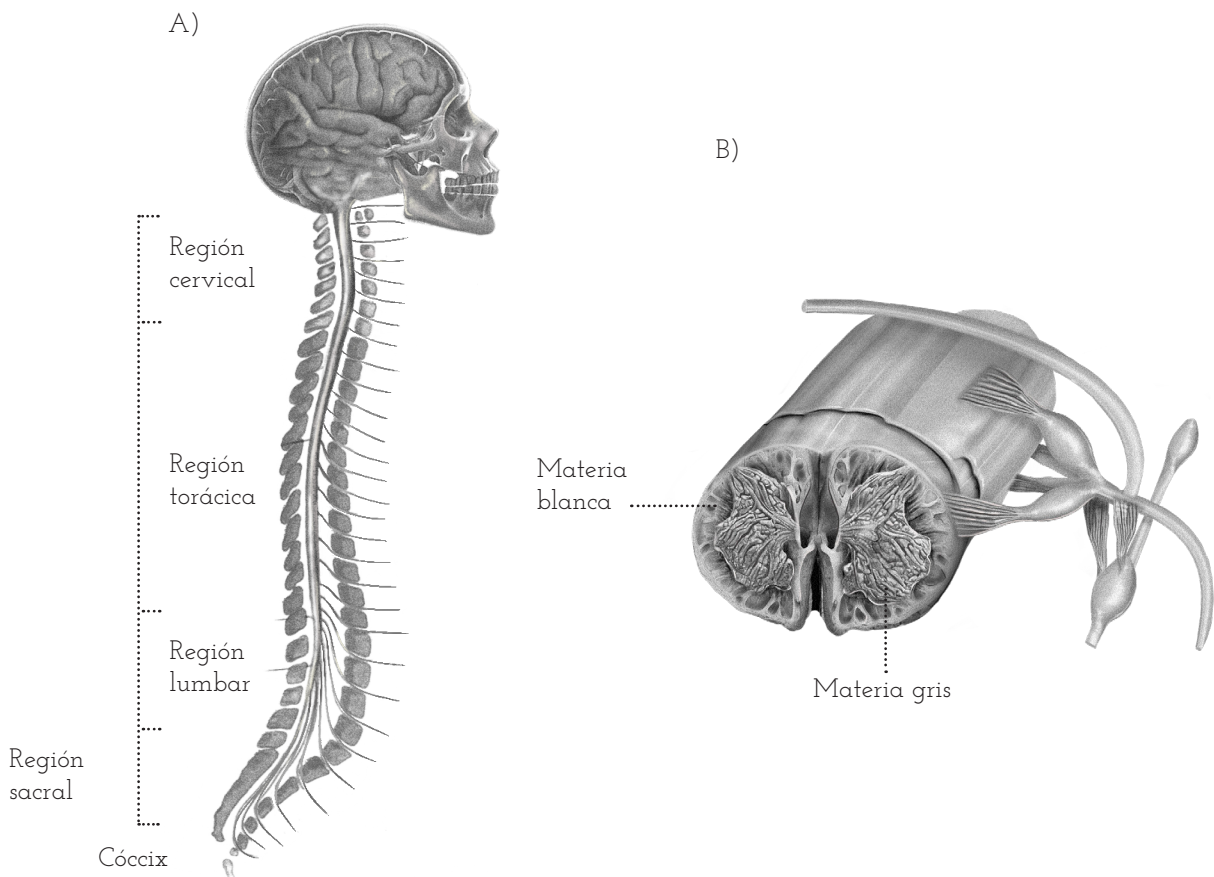


Figura 1: A) Anatomía humana de SNC. Imagen tomada y traducida de Cho, 2015 B) Corte transversal de médula espinal imagen tomada y traducida de Sheerín 2004.



2 Afectaciones

a la médula espinal de mamíferos que
comprometen su función

Existen múltiples causas que afectan directamente los nervios de la médula espinal limitando la capacidad motriz en humanos. A continuación, se mencionan las principales afecciones a la médula espinal:

Tabla 1:
Principales factores que provocan discapacidades motoras y sensoriales en humanos.

ENFERMEDADES			
Enfermedad	Características	Tratamiento	Referencias
Esclerosis múltiple (EM)	Provoca parálisis ascendente. Existe una pérdida de mielina. Puede provocar cuadriplejía. Se caracteriza por un estado de inflamación constante.	Administración de acetato de glatiramero (GA) e interferón β (IFN- β) como neuroprotectores. Administración de esteroides. Fármacos para la supresión del sistema inmune buscando reducción de inflamación.	Pérez Giraldo & Ortiz García, 2021, Zindler & Zipp, 2010, Pilz et al., 2008, Galetta & Bhattacharyya, 2019
Atrofia muscular espinal (AME)	Provoca atrofia y debilidad muscular como resultado del daño de motoneuronal en la médula espinal. Puede provocar insuficiencia respiratoria e incluso la muerte.	Terapia génica con vectores virales que expresan el gen SMN para la restauración neuronal.	Foust et al., 2010; Passini et al., 2010, Kolb & Kissel, 2015; Tisdale & Pellizzoni, 2015.
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	Enfermedad de carácter degenerativo a causa de muerte de neuronas motoras. Se manifiesta con debilidad de extremidades.	Fármaco Riluzol® (antagonista del glutamato) para retardar el uso de ventilación mecánica.	Castro-Rodríguez et al., 2021, Hardiman et al., 2011, Bensimon et al., 1994.
LESIONES DE MÉDULA			
Tipo de lesión	Características	Tratamiento	Referencias
Primaria	Daño mecánico inicial como consecuencia de un trauma físico externo y directo a la médula espinal debido lesiones contundentes. Ejemplo: heridas de bala, accidentes automovilísticos, caídas, a causa de prácticas deportivas, etc.	Terapia con esteroides en dosis altas, tiene como limitante la administración inmediata, en un plazo no superior a ocho horas posteriores al daño o no se tienen resultados favorables.	Hachem et al., 2017, Andrés-Cano et al., 2015, Druschel et al., 2013, Fan et al., 2018.

<p>Secundaria</p>	<p>Provocada por una cascada de cambios fisiológicos y bioquímicos en el interior y exterior celular. Se define como una fase de proceso degenerativo continuo tras la lesión. Los daños en la médula se traducen en problemas motores, sensoriales y autonómicos.</p> <p>Ejemplos: tetraplejía completa o incompleta.</p>	<p>Tratamiento farmacológico, corrección quirúrgica y uso de células madre.</p> <p>Las limitantes son los altos costos, el riesgo y complicaciones de recuperación y falta de estudios que garanticen la seguridad de las células madre para evitar la formación de tumores.</p>	<p>Pourcho <i>et al.</i>, 2001, Badner <i>et al.</i>, 2017, Tayanloo-Beik <i>et al.</i>, 2021, Estrada-Mondaca <i>et al.</i>, 2007</p>
-------------------	--	--	--

En lo que respecta a una LME, las diferentes ubicaciones y el alcance que tenga pueden causar diversos grados de discapacidad en las personas, que van desde la pérdida parcial de la función sensorial o motora hasta una parálisis completa debajo de la ubicación de la lesión (*Haisma et al., 2007*). En la figura 2 se ejemplifica el proceso que desencadena un daño puntual en la médula y se acompaña con el cuadro 2 que describe lo que ocurre en el nicho de la lesión.

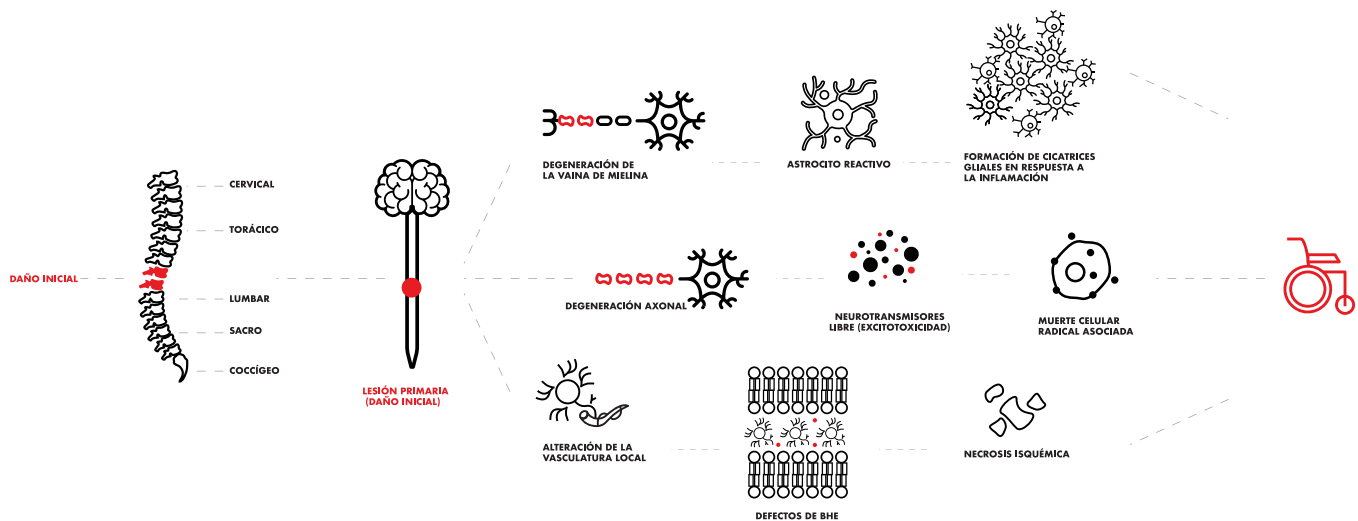


Figura 2: Daño de lesión primaria y secundaria tras una LME. El daño primario es seguido de una serie de eventos que desencadenan la pérdida de función neuromotora del individuo. Tomada y modificada de Tayanloo-Beik *et al.*, 2021.

Tabla 2: Principales procesos que ocurren en el sitio de una LME

Tipo de desequilibrio/proceso	Descripción	Referencia
Hemorragia e isquemia	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Destrucción de BHE <input type="checkbox"/> Liberación de citoquinas <input type="checkbox"/> Ferroptosis por acumulación de Fe (ver glosario) <input type="checkbox"/> Cambios en flujo sanguíneo/ falta de oxígeno en la zona <input type="checkbox"/> Falta de ATP a las células 	Stockwell, 2022, Beard <i>et al.</i> , 1993; D. Liu <i>et al.</i> , 2003, Mortazavi <i>et al.</i> , 2015, Sandler & Tator, 1976.
Desequilibrio iónico	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Daño en membranas celulares y canales iónicos <input type="checkbox"/> Ambiente celular citotóxico <input type="checkbox"/> Acidosis y apoptosis celular <input type="checkbox"/> Producción de radicales libres <input type="checkbox"/> Desmielinización de axones 	Lemke <i>et al.</i> , 1987; Sharma, 2005, W. M. Liu <i>et al.</i> , 2011, Nashmi & Fehlings, 2001.
Secreción de citoquinas	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Secreción de citoquinas e inflamación en zona dañada <input type="checkbox"/> Cambios en el microambiente medular <input type="checkbox"/> Aumento de la presión intersticial <input type="checkbox"/> Muerte de oligodendrocitos <input type="checkbox"/> Daño neuronal debido a sobreactivación de respuesta inflamatoria <input type="checkbox"/> Activación de microglía (propicia el estado inflamatorio) 	Xia & Zhu, 2015, Filella <i>et al.</i> , 2002, Paintlia <i>et al.</i> , 2011, Li <i>et al.</i> , 2001; N. K. Liu & Xu, 2012, Mukaino <i>et al.</i> , 2010.

Debido a todo lo que implica el mecanismo de los daños en la médula y las limitantes que existen para proponer tratamientos efectivos y seguros que garanticen una mayor recuperación de movimiento para los pacientes, son necesarias las investigaciones en modelos animales con capacidad regenerativa como es el caso del presente trabajo. Entender el comportamiento de las lesiones y los procesos que conllevan a una recuperación de funcionamiento en órganos dañados tendrá efectos beneficiosos en la medicina regenerativa, tal como sucede con el estudio de la regeneración en el pez (*Muneoka et al., 2008*).

3 Antecedentes



3.1 Generalidades de la regeneración

La regeneración ha sido una interrogante que se ha tratado de responder por muchos años. Los mamíferos poseemos cierto grado de regeneración y es visible en la piel, el hígado y la sangre, sin embargo, no somos capaces de regenerar extremidades u órganos complejos tras un daño y la poca capacidad regenerativa que poseemos, se va perdiendo con la madurez del organismo. La regeneración es variada entre especies y es evidente en organismos como salamandras, peces cebra, planarias, que pueden regenerar estructuras complejas como extremidades siendo perfectamente funcionales. Para poder explicar lo anterior, se propusieron dos teorías: una que indicaba que esta capacidad ha sido adquirida en algunas especies y otra que establecía que es una propiedad presente en todos los seres vivos y se ha perdido; en ambos casos el proceso de evolución y adaptación de las especies era un factor en común (Maden, 2018, King & Newmark, 2012).

Cuando ocurre un proceso regenerativo en cualquier organismo, existen una serie de pasos complejos que incluyen la participación de factores de crecimiento (participan entre otras cosas en la comunicación celular), apoptosis, rutas metabólicas, señales inflamatorias y antiinflamatorias, desdiferenciación y proliferación celular y todo esto es posible gracias a la participación de vías de señalización que desencadenan las acciones celulares necesaria para actuar en la zona de daño (Maden, 2018).

La identificación con ayuda de análisis bioinformáticos y moleculares de genes específicos que participan en la regeneración en modelos como el pez cebra debería ser útil para obtener información sobre mejores procesos terapéuticos en humanos debido a que esta capacidad ha disminuido en mamíferos con la evolución; sin embargo, la comprensión de los procesos celulares, moleculares y bioquímicos podría proporcionar la información del eslabón perdido. (King & Newmark, 2012; Noorimotlagh et al., 2017).

Hasta el momento se podría decir que el sistema inmune de los mamíferos es tan eficiente en el momento de una lesión de alto grado que impide la regeneración debido a que prioriza la cicatrización del daño, no obstante, hay mecanismos similares con aquellas especies que logran recuperar extremidades completas. Un ejemplo de estas similitudes es la señalización celular temprana para la formación de blastema que es un cúmulo de células madre que permiten la reparación de una lesión (Alibardi, 2018).

3.1.1 Formación de cicatrices en mamíferos después de una lesión en médula espinal

Una cicatriz es una respuesta del organismo para separar el tejido nervioso de las células inflamatorias como medida de reducción de la respuesta neuroinflamatoria. La formación y el contenido en estas cicatrices es una parte fundamental para entender la patología de la LME después de la respuesta inicial del organismo; transcurridas de dos semanas a seis meses post-lesión, la cicatriz se considera madura y existe poca regeneración en este punto haciendo que la comunicación de axones sea limitada e impidiendo el funcionamiento correcto en la médula espinal (*Siddiqui et al., 2015*).

En mamíferos, una cicatriz glial consiste en una acumulación de astrocitos fibrosos hipertróficos en la superficie de la lesión, denominados astrocitos reactivos, también está formada por microglía, macrófagos y mucha matriz extracelular. La superficie de los astrocitos reactivos cambia debido a la expresión de proteoglicanos inhibidores que son los responsables de la iniciación, adhesión, crecimiento y orientación de las neuritas nuevas. Adicional a esto, los fibroblastos del tejido conjuntivo adyacente proliferan sobre la capa de astrocitos fibrosos para depositar colágeno completando así la formación de una verdadera barrera que separa los axones de las neuronas que estaban conectadas antes de la lesión. El centro de la cicatriz está básicamente compuesto por células estromales (*Bovolenta et al., 1993; Canning et al., 1996*).

Como se mencionó, la capacidad regenerativa del SNC es extremadamente baja, aunado a esto, la activación de cascadas patológicas que interactúan entre sí hace imposible la reversión del daño. Hasta la fecha, no hay manera de predecir el comportamiento de los complicados procesos fisiopatológicos en cada individuo para guiar en el desarrollo de terapias generalizadas para LME pues las complicaciones de una lesión no ocurrirán de la misma forma en todas las personas afectadas, por lo que se buscan alternativas de investigación que brinden mayor información que complementen la existente (*Haisma et al., 2007*).

3.1.2 Regeneración evaluada en el laboratorio

Estudios con modelos de regeneración datan del año 1740 en los que el naturalista Abraham Trembley realizó experimentos con pólipos de agua dulce. El modelo consistió en cortar los pólipos a lo largo de diferentes planos y

encontró que estos tenían la capacidad de regeneración; además, observó que, al realizar el corte a la altura de la cabeza con tentáculos, este da lugar a un animal completamente nuevo llamándolo “animal Hydra”. Más tarde René Réaumur repitió este experimento encontrando resultados similares (*Maden, 1992; Sinigaglia et al., 2022*).

En la actualidad, conocemos diferentes especies regeneradoras de tejidos, un ejemplo claro son las ranas *Xenopus* en donde la regeneración de las extremidades ocurre hasta la etapa 51; a partir de este punto, disminuye y finalmente se pierde en ranas adultas. Otro ejemplo ocurre en ratones neonatos que son capaces de regenerar cardiomiocitos después de una lesión, pero nuevamente esta capacidad se pierde a los 7 días de edad (*Muneoka et al., 1986; Porrello et al., 2011*).

3.1.3 El pez cebra como modelo de regeneración

Un modelo animal ideal para estudios de regeneración debe tener varias características, algunas son: relevancia para la fisiopatología en humanos, la reproducibilidad del estudio (es decir, que pueda ser comprobado por diferentes investigadores obteniendo resultados similares), disponibilidad de individuos y el potencial de estos para regenerar lesiones de diversa gravedad en diferentes órganos y sistemas que sean observables y medibles (*Marques et al., 2019*).

El pez cebra es un modelo importante para estudios en humanos ya que los genomas son altamente similares (70% de similitud). Este fenómeno puede explicarse como consecuencia de la duplicación del genoma (*Vilella et al., 2009; Howe et al., 2013*). Aunado a esto, otros de los grandes beneficios son su rápida reproductividad, bajo costo de mantenimiento, alta disponibilidad de ejemplares debido a su tasa de reproducción, tiempo de desarrollo corto (72 horas post- fecundación), tamaño adecuado para observar el crecimiento sin necesidad de un microscopio y transparencia de los embriones que permite hacer un seguimiento directo de desarrollo y funcionamiento de órganos a microescala (*Antos et al., 2016; Tayanloo-Beik et al., 2021*).

Así, el pez cebra cumple con muchas de las ventajas buscadas en un modelo animal y es capaz de regenerar completamente la médula en la zona donde hubo pérdida de continuidad de tejido; esto es posible gracias a niveles bajos de apoptosis en respuesta a una lesión nerviosa, a un alto nivel de neurogénesis y formación de sinapsis funcionales utilizando las células

gliales residuales y por la expresión de genes específicos que le permiten la proliferación neuronal y la formación de lo que se conoce como “puente de tejido” en el lugar de una cicatriz, que sirve como peldaño para las nuevas neuronas, recuperando así la conectividad en la zona alrededor de las 4-6 semanas post daño (*Diaz Quiroz & Echeverri, 2013; Shi et al., 2015*). Es decir, la ausencia de formación de cicatrices gliales después de una lesión inducida le permite al pez cebra regenerar la médula y una gran cantidad de tejidos (*figuras 3 y 4*) (*Fang et al., 2012*).

Por último, la forma en la que entender la regeneración después de una lesión en el pez cebra puede ser de gran ayuda para las terapias actuales, debido a que se podrían hacer ensayos y estudios en mamíferos que producen cicatrices gliales impidiendo la reconexión de tejido como es el caso de los ratones, pero inhibiendo o potenciando genes que le permiten al pez crear un puente de tejido para una reconexión exitosa. Lo anterior puede ser posible únicamente si identificamos genes que sean altamente conservados entre especies y una vez identificados, debemos entender el comportamiento que tienen en especies con regeneración exitosa para tratar de reproducirlo en aquellas que no tienen esta capacidad.

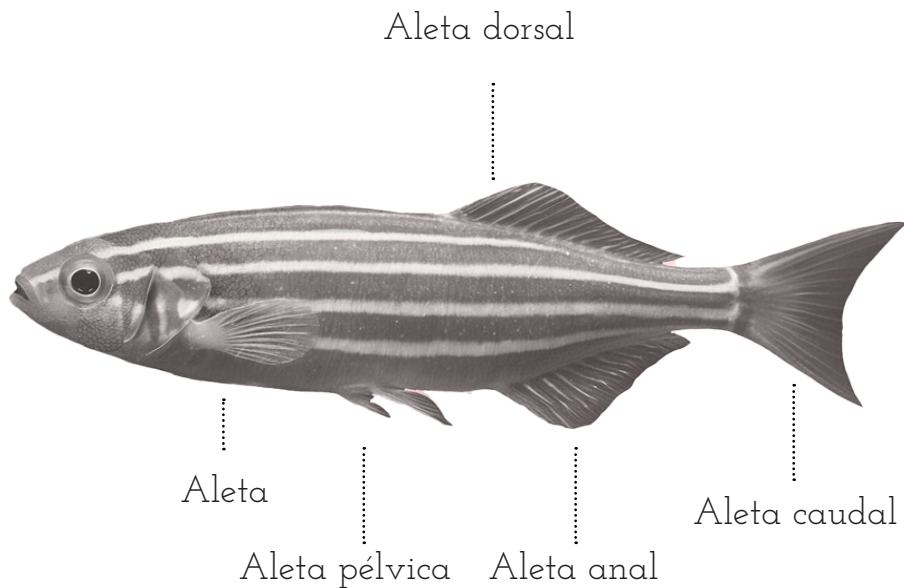


Figura 3: Esquema de pez cebra adulto. Elaboración propia.

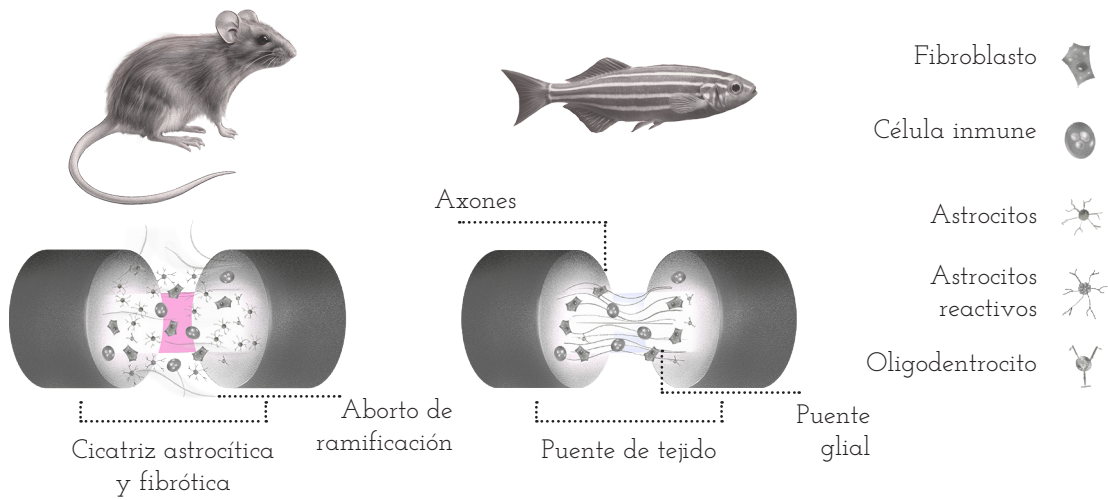


Figura 4: Comparación de comportamiento de una lesión en mamíferos y pez cebra tras una LME. Tomada y modificada de Cigliola *et al.*, 2020.

3.2 Vías de señalización

Las células que forman un organismo están sujetas a cambios físicos y químicos dentro y fuera de las mismas. El cambio se traduce en una respuesta por parte de la célula que le permite crecer, proliferar y diferenciarse desde el momento que se desollara hasta que muere, e incluso afecta la comunicación con otras células; este sistema dinámico es mediado en su mayoría por un sistema de proteínas que conducen señales químicas conocidas como vías de señalización (Iqbal *et al.*, 2010).

Existen diferentes tipos de señalización celular que desencadenan toda una vía interna; sin embargo, la más común es aquella en la que es necesaria la interacción de una molécula extracelular con un receptor de membrana celular; como consecuencia de este acoplamiento, se activa una o más respuestas intracelulares que van cuesta abajo para que la célula responda. Esta respuesta puede verse reflejada en la comunicación entre células, en migración celular, traducción de genes, crecimiento, proliferación, etc (Alberts *et al.*, 2022).

Como ocurre con diferentes organismos, el pez cebra ha conservado vías de señalización como Wnt, Hh, BMH, Notch, entre otras. Estas vías, en conjunto y por sí solas, contribuyen a la regeneración. Por ejemplo, durante la regene-

ración de la aleta del pez cebra, la vía Wnt desempeña el papel de formación del blastema que deriva en la proliferación de células progenitoras y a su vez en un tejido determinado (Mehta & Singh, 2019).

3.2.1 Proteínas Wingless

La familia Wingless (Wnt) está compuesta por 13 receptores y 19 ligandos y se encuentra altamente conservada filogenéticamente, estos se denominan con números y letras; por ejemplo, Wnt-5a, Wnt-10b, etc. (Nusse, 2008). La vía de señalización Wnt consiste en una serie de proteínas secretadas que desempeñan diferentes procesos celulares durante la vida embrionaria y adulta en vertebrados e invertebrados. Estos procesos incluyen embriogénesis, polaridad celular, organogénesis, determinación del eje ventral y dorsal, regeneración de tejidos, diferenciación de células madre y la proliferación celular en especies como *Xenopus* y *Danio rerio*. En mamíferos, Wnt promueve la diferenciación y plasticidad de las sinapsis y contribuye a la excitabilidad neuronal (El-Messaoudi & Renucci, 2001; Speese et al., 2012; Velasco & Riancho, 2008).

3.2.2 Genes frizzled

Los genes de la familia frizzled (fz) codifican proteínas transmembrana que varían en longitud de 500 a 700 aminoácidos y son necesarias para la transducción de señales Wnt (Bhanot et al., 1996).

Existen 10 genes frizzled divididos en cinco grupos principales. Fz1, fz2 y fz7 conforman la familia 1 y comparten cerca de un 75 % de identidad. Fz5 y fz8 son la subfamilia 2 y comparten 70% de identidad entre sí. Fz4, fz9 y fz10 comparten 65% de identidad siendo la subfamilia 3 y por último, fz3 y fz6 tienen un 50% de identidad de aminoácidos y conforman la subfamilia 5. (Y. Wang et al., 2016).

Las mutaciones dirigidas en 9 de los 10 genes fz de mamíferos han permitido entender el papel de sus funciones en un conjunto diverso de procesos homeostáticos y de desarrollo como los movimientos morfogenéticos responsables de la formación del paladar, el tabique ventricular, el surco ocular y el cierre del tubo neural; así como en la supervivencia de las neuronas, formación ósea, angiogénesis del SNC y formación y mantenimiento de la BHE (Y. Wang et al., 1996).

3.2.3 Frizzled en pez cebra

En la actualidad se conocen 14 secuencias en el pez cebra, las cuales están disponibles en bases de datos; sin embargo, solo algunas cuentan con un homólogo debido al proceso de duplicación del genoma. Las secuencias conocidas de frizzled en el pez cebra son: fz1, fz2, fz3a y su homólogo fz3b, fz4, fz5, fz5, fz7a, fz7b, fz8a, fz8b, fz9a, fz9b y fz10 (Au et al., 2010; Yu et al., 2010).

3.2.4 Frizzled 7a y frizzled 7b

Frizzled es uno de los genes más conservado entre especies. Por ejemplo, hay un 81% y 79% de identidad de secuencia de aminoácidos de fz7 en *Xenopus* y ratón, así como similitudes en los patrones de expresión. A pesar de ser un gen altamente conservado, puede tener un papel diferente en cada organismo, debido a que participa en la modulación de las vías de señalización canónicas y no canónicas cuando interactúa con los diferentes ligandos Wnt existentes. Un ejemplo es la presencia de fz7 en la vía de polaridad planar durante el desarrollo en vertebrados y el rol que tiene también en la vía de señalización mediada por B-catenina para mantener una homeostasis en el intestino de ratones (Sumanas et al., 2002, Larasati et al., 2022).

En el caso del pez cebra, la alta similitud de secuencia entre fz7a y fz7b sugiere que el locus fz7 se duplicó en el curso de la evolución de los peces teleosteos. A pesar de que fz7a y fz7b comparten una similitud de secuencia muy fuerte, existen diferencias importantes en sus patrones de expresión que sugieren que los dos ortólogos del pez cebra pueden haber adoptado diferentes roles de desarrollo en el curso de la evolución (Djiane et al., 2000).

La sobreexpresión de fz7a y fz7b en el pez cebra interrumpe la gastrulación impidiendo que se lleve a cabo de la forma adecuada. La expresión de fz7a se detectó en el cerebro anterior, cerebro posterior, mesencéfalo, médula espinal, en la parte anterior de las somitas en desarrollo y dentro del mesodermo lateral (El-Messaoudi & Renucci, 2001); mientras que fz7b se expresó dentro del sistema nervioso central, mesodermo somático y lateral, línea lateral, brote de la aleta pélvica y arcos faríngeos (Sumanas et al., 2002).

La diferencia más importante entre ambos genes es el patrón de expresión. Fz7a se expresa fuertemente en el cerebro después de 2 días post-fertiliza-

ción (dpf), mientras que *fz7b* no; sin embargo, se expresa dentro de la línea lateral. A medida que avanza el desarrollo, la expresión de *fz7a* y *fz7b* se localiza en diferentes lugares y tejidos, lo que hace visible que, a pesar de ser ortólogos, no desempeñen la misma función durante el desarrollo y en diferentes momentos de la vida del pez (*Djiane et al., 2000; Knowlton & Kelly, 2004*).

Además, García-Rodríguez (2023) demostró la presencia del gen *fz7b* en oocitos de pez cebra, confirmando que es un gen de origen materno, y que una vez que el oocito es fecundado, el gen tiene expresión en la médula espinal durante las primeras 48 horas post fertilización. Lo anterior demuestra su participación en la formación del sistema nervioso en el pez, así como en los movimientos de convergencia celular durante el desarrollo.

Datos no publicados de García-Morales y colaboradores, demostraron que al inyectar ARNm de *frizzled7* en *Xenopus laevis*, hay una inducción de neuronas de la médula espinal, lo que podría dar indicios de la importancia del gen en la regeneración de médula espinal en pez cebra, ya que, a pesar de ser especies distintas, se ha observado similitud en el patrón de expresión entre ambos, y el pez cebra conserva la capacidad regenerativa hasta estadios adultos. De acuerdo con Larasati y colaboradores (2022), el gen *frizzled7* participa de forma directa en la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina y está presente en la formación del SNC en el desarrollo del pez cebra; sin embargo, no se han reportado estudios que validen su expresión durante y después de una lesión de médula.

3.3 Vías canónicas y no canónicas

La activación que tienen lugar una vez que un ligando Wnt se une a un receptor *frizzled*, induce diversas señales intracelulares que en conjunto se dividen en dos grandes grupos: la vía canónica o clásica y la vía no canónica. (*Gordon & Nusse, 2006*).

3.3.1 Vía canónica

En ausencia de Wnt como ligando extracelular, la proteína citoplasmática β -catenina se degrada constantemente por la acción del complejo Axina, que está compuesto por la proteína Axina + el producto del gen APC + caseína quinasa 1 (CK1) + glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). CK1 y GSK3 son

los encargados de fosforilar consecuentemente la región amino terminal de la β -catenina, lo que resulta en su reconocimiento por una ubiquitina, misma que la conduce a su degradación proteosómica. Esta eliminación continua de en el proteosoma, e impide que la β -catenina llegue al núcleo, los genes diana para la transcripción son reprimidos por la familia de proteínas del factor de células T que actúan como factores de transcripción unidos al ADN o bien, por un factor potenciador linfoide llamados TCF/LEF respectivamente. (Figura 7) (He et al., 2004; MacDonald et al., 2009).

Existen dos familias distintas de receptores que son críticas para la señalización Wnt/ β -catenina: los receptores transmembrana de siete pasos Frizzled (Fz) y las proteínas 5 y 6 relacionadas con el receptor LDL (LRP5 y LRP6) siendo estos dos últimos esenciales para la homeostasis ósea en adultos. Así, la vía Wnt/ β -catenina se activa si un ligando Wnt se une al receptor transmembrana Frizzled y este a su vez se une a su co-receptor, la proteína 6 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP6) o el co-receptor LRP5 de la misma familia. De esta forma, la formación del complejo Wnt-Fz-LRP6 junto con el reclutamiento de la proteína de andamiaje Dishevelled (Dsh) da como resultado la fosforilación y activación de LRP6 y ocurre el reclutamiento del complejo Axina a los receptores. Esto conduce a la inhibición de la fosforilación de β -catenina mediada por Axina y, por lo tanto, a la acumulación de la β -catenina que viaja al núcleo para formar complejos con TCF / LEF y activa la expresión génica (MacDonald et al., 2009).

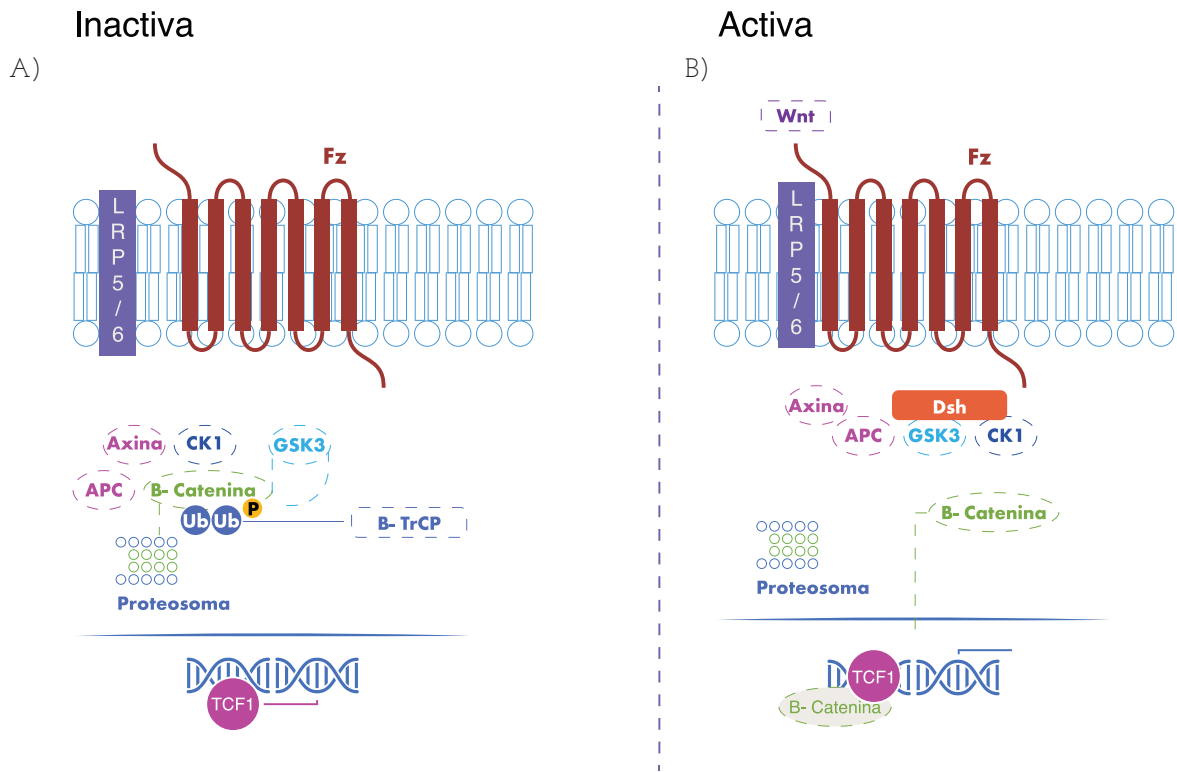


Figura 5: Vía de señalización canónica Wnt explicada. A) En ausencia de Wnt, la Vía está inactiva. B) En presencia del ligando Wnt la vía se activa e inicia la señalización cascada abajo. Elaboración propia.

3.3.2 Vía Wnt/B-catenina en regeneración de médula

Briona y colaboradores (2015), indujeron una lesión medular en embriones de pez cebra y observaron la neurogénesis en peces control y un grupo que era sometido a la inhibición de la vía de señalización Wnt mediada por la proteína Dkk1 a la que se le añadió un reportero GFP. Encontraron una menor neurogénesis 5 días posteriores a la lesión en aquellos embriones de pez cebra tratados con la proteína Dkk1, así como la expresión de la misma gracias al reportero GFP (Briona *et al.*, 2015).

Lo anterior indica que la vía de señalización Wnt juega un papel importante en la neurogénesis post-lesión de médula y al estar inhibida por el antagonista Dkk1, no es posible la traducción de genes clave para el proceso regenerativo; sin embargo, es necesario complementar esta investigación con la identificación del receptor que participa en la vía y hace posible la traducción

de la señal en el interior celular. En otro estudio realizado por Strand y colaboradores (2016), se demostró que la transcripción mediada por Wnt/ β -catenina aumentó en la regeneración de médula espinal usando peces cebras transgénicos con un gen reportero de β -catenina; estos dos estudios dan pauta para seguir el camino en la búsqueda de el o los receptores involucrados en la transcripción de señales Wnt mediadas por β -catenina en procesos regenerativos de médula espinal.

3.3.3 Vías no canónicas

Actualmente se han descrito diversas vías Wnt no canónicas; todas ellas se caracterizan por no requerir la acumulación de β -catenina para culminar su cascada de señalización. La activación de las diferentes vías no canónicas se encuentra determinada por los distintos receptores a los que pueden unirse los ligandos Wnt.

3.3.4 Vía de polaridad planar celular (PCP)

Recibe este nombre debido a la polarización de las células en una capa epitelial, lo que ocurre por ejemplo durante la orientación de cilios o flagelos. La polaridad planar es transmitida localmente de célula a célula; es decir, tiene una señalización de tipo parácrina y es dependiente de los receptores fz y la proteína Dsh. Esta vía también puede regular la polaridad celular de manera no epitelial, como en la extensión convergente que ocurre en la gastrulación y la reestructuración del citoesqueleto (*Gao & Chen, 2010*).

La vía PCP se inicia cuando la unión de Wnt al receptor fz activa a las proteínas de unión a GTP RhoA y Rac, así como a sus quinasas efectoras: Rho-quinasa y JNK, promoviendo su translocación al núcleo. La vía se interrumpe por la acción de las proteínas Van Gogh (Vangl) y Prickle (Pk) (Figura 8). Esta vía se asocia con la reordenación del citoesqueleto y la adhesión celular, regulando los movimientos de la célula y su disposición. Es importante mencionar que la cascada no tiene por qué ser estrictamente a nivel epitelial (*Gálvez-Navas et al., 2021; Rao & Kühl, 2010*).

VÍA PCP

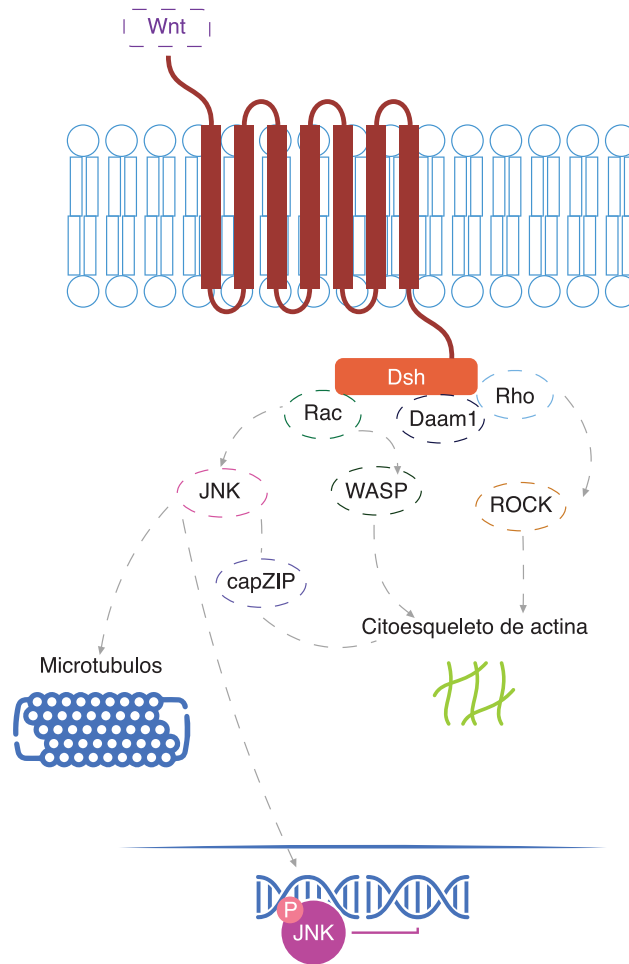


Figura 6: activación de la vía de señalización no canónica Wnt/PCP. Tomada y modificada de Sánchez, 2020.

3.3.5 Vía del calcio

Se puede activar por unión del Wnt a fz o bien al receptor ROR2. Esta unión se traduce en una activación de las proteínas G, que actúan sobre PLC, aumentando los niveles citoplasmáticos de diacilglicéridos (DAGs) e inositol trifosfato (IP3). Por su parte, el IP3 difunde hasta el retículo endoplasmático liso (REL), permitiendo la liberación del Ca²⁺ que está contenido en este. El aumento del Ca²⁺ puede tener como resultado la inhibición de la proteína quinasa G (PKG) por medio de la proteína p38. El Ca²⁺ activa al calcio/calmodulina dependiente de quinasa II (CaMKII) y a su vez, a la calcineurina, la cual interviene en la activación del NFAT (Factor nuclear de células T activadas). Por su parte, DAGs activa a la proteína quinasa C (PKC) a nivel de la membrana y como resultado, el IκB actúa sobre el factor nuclear κB (NF-κB). Este último migrará al núcleo y en conjunto con NFAT, intervendrán como factores de transcripción (*Amal et al., 2019; Gálvez-Navas et al., 2021; Uehara et al., 2018; Wang et al., 2019*).

VÍA DEL CALCIO

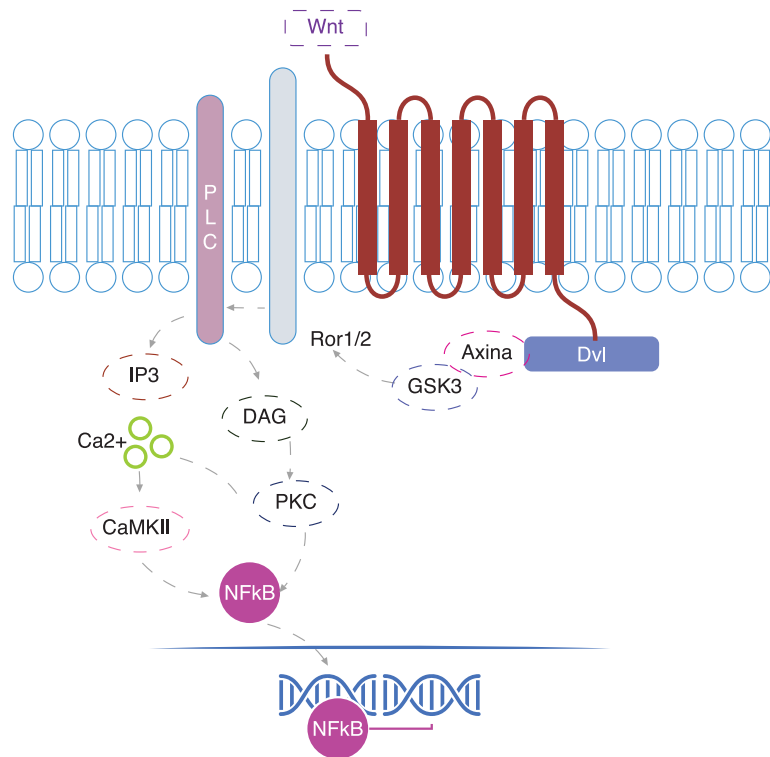


Figura 7: Activación de vía de señalización no canónica Wnt/Ca²⁺. Tomada y modificada de De, 2011.

3.4 Genes presentes en el estudio

Una de las técnicas más usadas en la evaluación de genes en biología molecular, es la de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Al ser una técnica de alta especificidad para la evaluación de genes de interés, existen diferentes aspectos a considerar y uno de los iniciales es la elección de un gen de control interno. Este gen asegura la eficiencia de la reacción ya que permite la fácil detección de falsos negativos en la prueba. Normalmente se usan genes que codifican para proteínas que se expresan constitutivamente para el mantenimiento de la función celular, una de las características importantes de estos genes es el nivel de expresión alto y estable, en otras palabras, son genes que están presentes en casi todos los tipos celulares o en la mayoría de ellos (*Casadei et al., 2011; Moret et al., 2019*).

3.4.1 β -actina

La proteína β -actina se polimeriza para ser constituyente del citoesqueleto cuya función es dar estabilidad y dirección a las paredes celulares, es esencial desde el desarrollo hasta la vida adulta de las células y ha tenido poca divergencia evolutiva desde algas, levaduras y peces. En el caso de la similitud que existe entre la β -actina del humano y del pez cebra, existe un 98% de similitud teniendo únicamente 5 mutaciones diferentes entre ambas especies (*Moret et al., 2019*).

3.4.2 Fz7b

Este gen se expresa en diferentes estructuras a lo largo del desarrollo del pez cebra como gastrulación, inducción de células de la cresta neural, inducción del estadio epibolia y en el funcionamiento del sistema nervioso central a lo largo de la vida adulta del pez (*Ungar & Calvey, 2002*).



4 Justificación

Esta tesis tiene como finalidad proporcionar información innovadora en el campo de la regeneración celular **mediante un estudio del gen frizzled 7 en el modelo animal Danio rerio**, específicamente en adultos sometidos a una lesión de médula espinal.

Utilizando la técnica de RT-PCR, se llevará a cabo un análisis cualitativo y semicuantitativo del comportamiento de este gen en diferentes momentos post-lesión. Los resultados de este estudio ofrecerán una visión valiosa sobre el potencial regenerativo asociado con **frizzled 7**, mismos que pueden servir de base para nuevas investigaciones futuras buscando el desarrollo de nuevas terapias para la recuperación de la movilidad en mamíferos.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Analizar el patrón de expresión de *frizzled 7* durante el proceso de **regeneración de médula en el pez cebra adulto** empleando la técnica de **RT-PCR**.

5.2 Objetivos específicos

Estandarizar la técnica de lesión de médula espinal en pez cebra adulto.

Establecer la técnica adecuada para la extracción de ARN del tejido dañado y circundante en ejemplares adultos de pez cebra.

Estandarizar la técnica RT-PCR para los genes *frizzled 7* y β -actina de pez cebra.

Evaluar semi-cuantitativamente la expresión del gen *frizzled 7* en la regeneración de la médula espinal en el pez cebra.

Determinar mediante RT-PCR el periodo de regeneración medular con mayor expresión de *frizzled 7*.

6 Método

6.1 Cuidado y mantenimiento de la colonia de peces cebra

Los ejemplares de *D. rerio* fueron obtenidos de un proveedor comercial dedicado a la reproducción de peces cebra “wild-type” en Toluca de Lerdo. Los peces se mantuvieron en el Laboratorio de Biología Molecular y del Desarrollo (LaBiMoDe) para asegurar su crecimiento hasta el estadio adulto con las condiciones sugeridas por Westerfield (1993) en la sección de “animales acuáticos” (ZFIN: Zebrafish Book: Contents, 1993), asegurando un correcto desarrollo y ausencia de enfermedades en los ejemplares usados. La colonia fue mantenida bajo condiciones de cuidado ético reportadas por la guía internacional “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Nih et al., 2011) y por lo sugerido para el cuidado y mantenimiento por Westerfield (1993). Los métodos para la experimentación fueron los seguidos y respaldados por ASPA y “Guidelines for use of zebrafish in research, teaching and testing” (University of Maine, 2011).

Los peces se mantuvieron separados por sexos en peceras de 40L con una temperatura de 28°C con aeración y filtración automáticas las 24 horas, se realizaron recambios diarios de agua desclorada del 20% de la capacidad de la pecera. Los organismos fueron alimentados diariamente, tres veces al día, con alimento comercial en hojuelas pulverizado administrado con alimentadores automáticos, además se suplementaron con alimento vivo (*Artemia*), los ciclos de luz: oscuridad usados durante el experimento fueron de 14:10h.

6.2 Elección de genes en base de datos

Para la elección de genes a utilizar en el trabajo, se buscó información de artículos publicados en bases de datos como NCBI, ZFIN y PubMed.

Las búsquedas obligadamente debían ser de trabajos previos realizados en pez cebra para optar por un gen de control interno ya reportado y usado en esta especie. Referente a la lesión medular, se buscaron artículos que tuvieran experimentación o revisión bibliográfica de genes o moléculas presentes en la regeneración de la médula espinal y/o sistema nervioso en peces cebra.

6.3 Lesión de médula espinal de pez cebra adulto

Se usaron peces adultos de aproximadamente cinco meses de edad y de 2.5 a 3.0 cm de longitud total. Se usaron tres peces para cada tratamiento. Los tratamientos empleados se especifican en la tabla 3.

Tabla 3: Tratamientos para experimentación de regeneración de médula espinal en pez cebra adulto.

Grupo	Tipo de grupo	Evaluación por realizar
1	Control sin lesión	Grupo control de referencia para expresión de fz7b
2	Control con lesión muscular	Grupo control de referencia para expresión de fz7b
3	Lesión en médula	Expresión de fz7b 0 dpl
4	Lesión en médula	Expresión de fz7b 1 dpl
5	Lesión en médula	Expresión de fz7b 3 dpl
6	Lesión en médula	Expresión de fz7b 15 dpl
7	Lesión en médula	Expresión de fz7b 30 dpl

Cada tratamiento se realizó por duplicado para corroborar los resultados, empleando un total de 42 ejemplares.

Los días de recolección de tejido se definieron con base a Cigliola y colaboradores (2020), que describen el proceso tras una lesión de médula en peces cebra en el que existe una pérdida de conexión de tejido, seguido de la formación de un puente glial y concluyendo con la regeneración completa en peces cebra adultos trascurridos 30 días post-lesión.

Para realizar la lesión se siguió el protocolo de Fang y colaboradores (2012). Se sumergió al pez en una solución de triclaína al 0.2% por unos minutos hasta no observar movimiento de los opérculos o la boca para lograr una anestesia de grado quirúrgico, posterior a esto se sumergió en agua limpia sin triclaína para eliminar el exceso de anestesia. Una vez anestesiado, se retiró el excedente de agua y se colocó en una caja Petri para observarlo bajo el microscopio estereoscópico y localizar la zona en la que se realizó la incisión con ayuda de un bisturí estéril cercana a la aleta dorsal en dirección caudal (Figura 8). La incisión se realizó cortando el tejido hasta llegar a la médula espinal, una vez ubicada, fue seccionada por completo y el pez se colocó en una pecera aislada con agua estéril para su recuperación de acuerdo con los diferentes tratamientos.

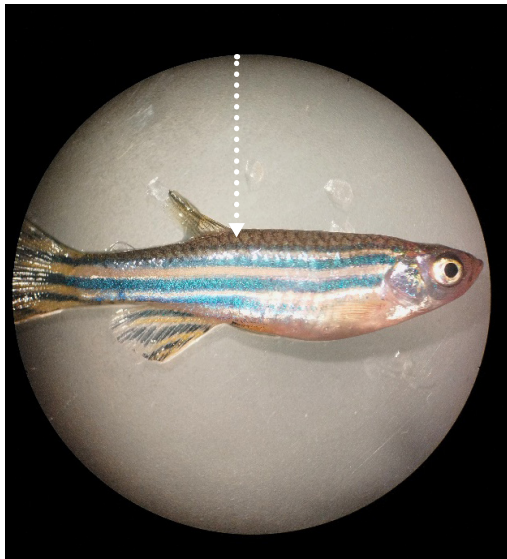


Figura 8: Preparación de ejemplar para lesión de médula. Pez visto con microscopio estereoscópico previo a la lesión medular. Magnificación 5x. Se indica con flecha la zona en la que se realizó la lesión.

Para asegurar una correcta recuperación, se añadió periódicamente azul de metileno a la pecera y se mantuvo el recambio diario del 20% de agua que fue esterilizada en autoclave y previamente desclorada, la alimentación se reanudó al segundo día post lesión, una vez al día, para evitar crecimiento de bacterias en la zona de la herida. Después de una semana se aumentó a dos veces por día.

Una vez cumplido el plazo de regeneración de interés, los individuos se sacrificaron por sobredosis de anestesia usando la misma concentración, pero esta vez prolongando el tiempo de exposición, aproximadamente a los 10 minutos ya no se observaron reflejos en todos los peces sacrificados.

6.4 Extracción de ARN

Inmediatamente después del sacrificio, se colocó el pez en un mortero estéril con nitrógeno líquido para evitar la actividad de las ribonucleasas posterior a la muerte del pez. Este paso aseguró mantener la integridad del RNA en la zona de la lesión o el fragmento de la médula no lesionada, según el caso. Posteriormente se procedió a la extracción. La metodología usada para la

extracción siguió los protocolos de Jong y colaboradores (2010) y Mendez y colaboradores (2011).

Una vez en nitrógeno y con ayuda de bisturí y espátula, se flanqueó la lesión medular aproximadamente 1 mm de cada lado y el resto fue desechado. Usando pinzas más finas se retiró el exceso de tejido de la porción de médula conservando únicamente el fragmento de médula espinal de interés. Esta sección se maceró con pistilo y el polvo obtenido se recolectó en tubos libres de DNAsas y RNAsas con 1 mL de TRI Reagent® para su posterior procesamiento.

Para la extracción, se usaron 1000 μ L de TRI reagent para cada tubo de muestra que contenía 3 porciones de médula espinal de 3 peces pulverizadas con nitrógeno líquido, se agitaron vigorosamente por 15 segundos en el agitador vortexer y se dejaron reposar por 3 minutos. Enseguida, se agregaron 200 μ L de cloroformo y vortexearon nuevamente por 15 segundos para después dejar reposar a temperatura ambiente por 3 minutos.

Se centrifugaron por 15 minutos a 12000 xg y 4 °C. Al finalizar se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio, agregando nuevamente 200 μ L de cloroformo vortexeando 15 segundos, se dejó reposar la muestra 3 minutos en hielo y se repitió el paso de centrifugación con los mismos parámetros. La fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 500 μ L de isopropanol grado molecular, invirtiendo 5 veces para mezclar suavemente. Se dejó reposar la muestra en hielo por 10 minutos y posteriormente se llevó a centrifugación por 10 minutos a 12,000 xg y 4 °C. Terminando este paso se logró observar pellet en todas las muestras. Cuidadosamente se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75% grado molecular y se llevó a centrifugación por 5 minutos a 7500 xg por 5 minutos y 4 °C. Este paso se realizó un par de veces más retirando el sobrenadante en cada una y repitiendo las cantidades y condiciones de centrifugado. Al finalizar se retiró el exceso de etanol y se colocó la muestra en baño seco a 65°C por 2 minutos para evaporar cualquier excedente. Al finalizar, se resuspendió la muestra de RNA en 30 μ L de agua libre de nucleasas, se midió la concentración y pureza en un espectrofotómetro UV Nanodrop 2000 y se guardó el resto en ultracongelación (-80°C) para su posterior uso.

Nota: todos los tubos usados fueron libres de ARNsas y ADNsas y los reactivos grado molecular marca Sigma.

6.5 Síntesis de ADNc

Para tener una concentración estandarizada de ADNc, se ajustó la reacción de retrotranscripción a 1 μg de ARNm. Se usó la enzima retrotranscriptasa M-MLV con concentración inicial de 200u/ μL marca sigma, Oligo dT con concentración inicial de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ marca Promega, dNTP mix con concentración de 10mM marca Promega y RNA sin marca Promega. El ensamble de la reacción se muestra en la tabla 4. La síntesis se llevó a cabo en un termociclador Select BioProducts, con un ciclado que se muestra en la tabla 5.

Tabla 4: Máster Mix para retrotranscripción con volumen total de 25 μL .

Reactivo	[final]	Rx (25 μL)
MMLV 200 u/ μL	200 u/ μL	1 μL
Buffer de enzima 10x	1x	2.5 μL
Oligo dT 500nm	500 nM	1 μL
dNTPmix 10mM	10 mM	1.25 μL
RNAsin 40 u/ μL	4 u/ μL	0.1 μL
Agua libre de nucleasas	N/A	Hasta 25ul
Muestra de RNA	1 μg	

Tabla 5: Ciclado usado para obtención de ADNc con retrotranscripción.

Paso	Temperatura	Tiempo total
Desnaturalización del ARN	70°C	15 minutos
Polimerización	42°C	70 minutos
Desactivación de enzima	4°C	10 minutos

6.6 RT-PCR

La estandarización se realizó para el gen β -actina y Frizzled 7b, para ello se usaron muestras de ADNc obtenidas de peces control, es decir peces adultos que no tenían ninguna lesión. La enzima polimerasa usada fue GoTaq (Promega), dNTPmix de concentración inicial 10 mM (Promega), Oligonucleótidos (T4 Oligo) y agua libre de nucleasas (Sigma). Se realizó un gradiente de temperatura tomando como criterio lo sugerido por el proveedor de oligonucleótidos con 2 grados más y 2 grados menos de temperatura, así como

la concentración de oligonucleótidos y la cantidad de ciclos hasta encontrar la óptima para las reacciones con todas las muestras. La cantidad de ADNc usado fue siempre 1 μL ya que se tenía la certeza de la concentración usada gracias al ajuste en la reacción de retrotranscripción que aseguró una concentración semejante de ADNc para todas las reacciones. El ensamble óptimo para las reacciones de PCR usado fue el que se indica en la tabla 6.

Tabla 6: Master mix para reacción de RT-PCR

Reactivo	[final]	Rx (25 μL)
Agua libre de nucleasas	N/A	15.875 μL
Green buffer 5X	1x	5 μL
dNTPmix 10 mM	200nM	0.5 μL
Primer forward 10 μM	500nM	1.25 μL
Primer reverse 10 μM	500nM	1.25 μL
GoTaq 5u/ μL	1.25u/ μL	0.125 μL
ADNc	1 μg	1 μL

6.7 Electroforesis

Para visualizar los productos de la RT-PCR, se usó intercalador SYBR DNA Stain (Jena Bioscience) colocando en cada pocillo 8 μL de muestra y 0.8 μL de SYBR DNA Stain. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa (Top-Vision) al 2 %, en TBE. El voltaje usado fue de 90 volts por 40 minutos, finalmente para ver el gel se usó una cámara BlueGel de luz azul.

7 Resultados y discusión

7.1 Expresión de genes en peces cebra

β -actina

Se usó la base de datos de ZFIN para ver la expresión del gen en los diferentes estadios del pez. El mapa de expresión (figura 9) muestra que este gen está presente en la mayoría de los estadios que componen la vida del pez, sin embargo, es importante resaltar la presencia de β -actina en estadio adulto, lo que permite su uso como gen de control interno.

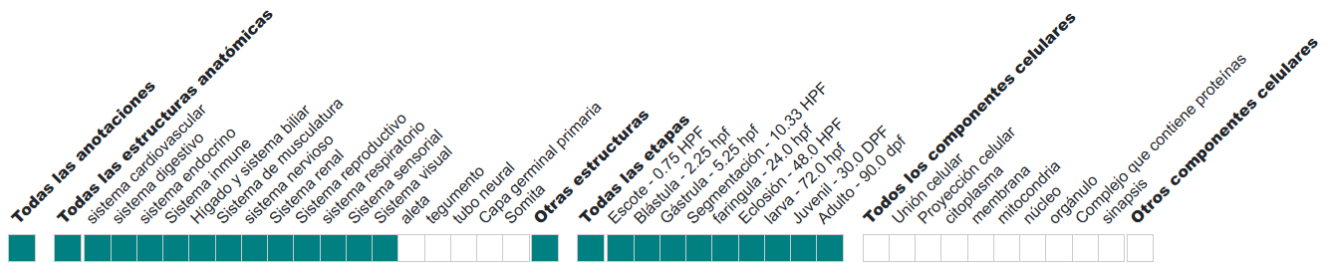


Figura 9: Expresión de β -actina en diferentes sistemas y estadios del pez cebra. Los cuadros de color señalan los sistemas y estadios en los que se expresa el gen, mientras que los cuadros vacíos indican que no hay expresión. Tomada de la base de ZFIN.

Frizzled 7a

Contrario a lo que se observó con β -actina, frizzled 7a no se expresa en peces en estadio adulto, como se observa en la figura 10. Durante la etapa adulta, la expresión génica de este ortólogo se silencia por algún proceso biológico que no se describe en la presente tesis.



Figura 10: Expresión de fz7a en diferentes sistemas y estadios del pez cebra. Los cuadros verdes indican los sistemas y estadios donde se expresa el gen fz7a. Para el presente estudio es importante notar que este gen no se expresa en estadio adulto. Tomada de la base de ZFIN.

Lo anterior hace que se descarte este gen para la evaluación de su expresión durante la regeneración medular en peces cebra adultos.

Frizzled 7b

Por otro lado, frizzled 7b sí tiene expresión en adultos (figura 11), este gen está presente en todos los estadios desde las 0 horas post fertilización hasta los 90 días post fertilización. Por esta razón este gen es el candidato ideal para su evaluación durante el proceso de regeneración. De acuerdo con lo observado por García-Morales y colaboradores 2009 en *Xenopus laevis*, se eligió a frizzled7 como gen candidato para la evaluación y después de la revisión bioinformática de su expresión, únicamente se consideró al gen fzd7b para el experimento.

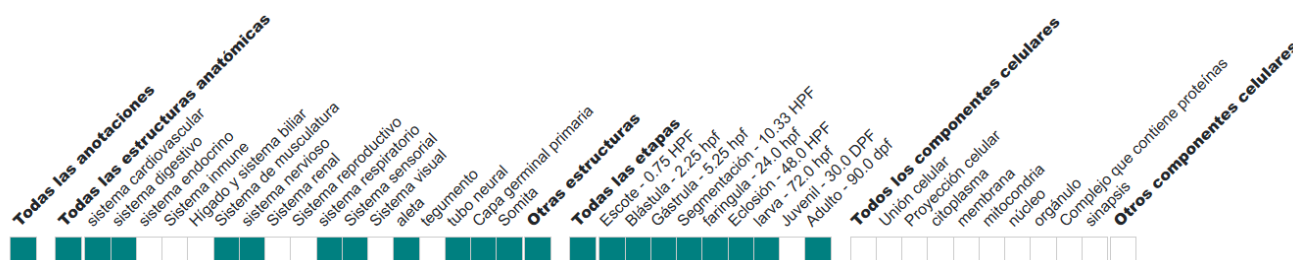


Figura 11: Expresión de fzd7b en diferentes sistemas y estadios del pez cebra. Los cuadros verdes indican los sistemas y estadios con expresión del gen fzd7b. El gen se expresa en estadio adulto. Tomada de la base de ZFIN.

7.2 Obtención de Oligonucleótidos

Después de la revisión de la información obtenida de las bases de datos, se eligieron el par de oligonucleótidos para el gen de control interno β -actina del trabajo reportado por Zou y colaboradores (2009) en una investigación sobre de la duplicación y conservación de genes en pez cebra siendo los siguientes:

Oligonucleótido sentido para β -actina	CTTGCGGTATCCACGAGAC
Oligonucleótido antisentido para β -actina	GCGCCATACAGAGCAGAA

En el caso del gen frizzled 7b, se tomaron los oligonucleótidos reportados por Ungar y Calvey (2002) en un estudio realizado para examinar la expresión de fz7b en diferentes momentos del proceso de embriogénesis. Los oligos reportados son los siguientes:

Oligonucleótido sentido de fz7b	CCGCATTTTGGGTCATTTTCTCATAG
Oligonucleótido antisentido de fz7b	AATACATCGCACATCTTTTGACAG

Nota: al gen frizzled 7a no fue considerado ya que existe un silenciamiento en el estadio adulto, según lo reportado en los datos obtenidos del análisis bioinformático en la base de datos ZFIN.

7.2.1 Determinación del tamaño de amplicón

Se realizó la búsqueda del tamaño de amplicón resultante para β -actina para el análisis del gel resultante de las reacciones de PCR. Esta medida en pares de bases se obtuvo con la herramienta bioinformática Primer-BLAST, para ello se introdujo la secuencia de los oligos de interés y se corroboró su especificidad con el organismo, a su vez el análisis arrojó un resultado de 426 pb coincidiendo con lo reportado por Zou y colaboradores (2009) (Figura 12).

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTTGCGGTATCCACGAGAC	19	58.04	57.89	4.00	3.00
Reverse primer	GCGCCATACAGAGCAGAA	18	57.48	55.56	4.00	0.00
Products on target templates						
>NM_131031.2 Danio rerio actin, beta 1 (actb1), mRNA						
product length = 426						
Forward primer	1 CTTGCGGTATCCACGAGAC	19				
Template	913T.....	931				
Reverse primer	1 GCGCCATACAGAGCAGAA	18				
Template	1338T.....	1321				

Figura 12: Resultado de Primer-BLAST para saber tamaño de amplicón de β -actina.

Debido a que en la literatura no se encontró el tamaño de fz7b, se realizó el mismo procedimiento para β -actina y se obtuvo un tamaño de 287 pb para la banda esperada usando los oligonucleótidos de fz7b reportados por Ungar y Calvey (2002) (Figura 13).

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCGCATTTTGGGTCATTTTCTCATAG	26	61.17	42.31	2.00	2.00
Reverse primer	AATACATCGCACATCTTTTGACAG	24	58.13	37.50	3.00	2.00
Products on target templates						
>NM_170763.2 Danio rerio frizzled class receptor 7b (fzd7b), mRNA						
product length = 287						
Forward primer	1 CCGCATTTTGGGTCATTTTCTCATAG	26				
Template	2494T.....	2519				
Reverse primer	1 AATACATCGCACATCTTTTGACAG	24				
Template	2780T.....	2757				

Figura 13: Resultado de tamaño de amplicón de acuerdo con Primer-BLAST para fz7b.

7.2.2 Expresión de Frizzled7 en diferentes tejidos

Para corroborar la expresión génica de ARNm de β -actina a nivel de la médula espinal, se verificó en la plataforma BioGPS (Figura 14); esta es una interfaz en línea que contiene la información de diversas fuentes científicas de genes y la resume para facilitar su análisis y permite visualizar fácilmente la expresión de estos.

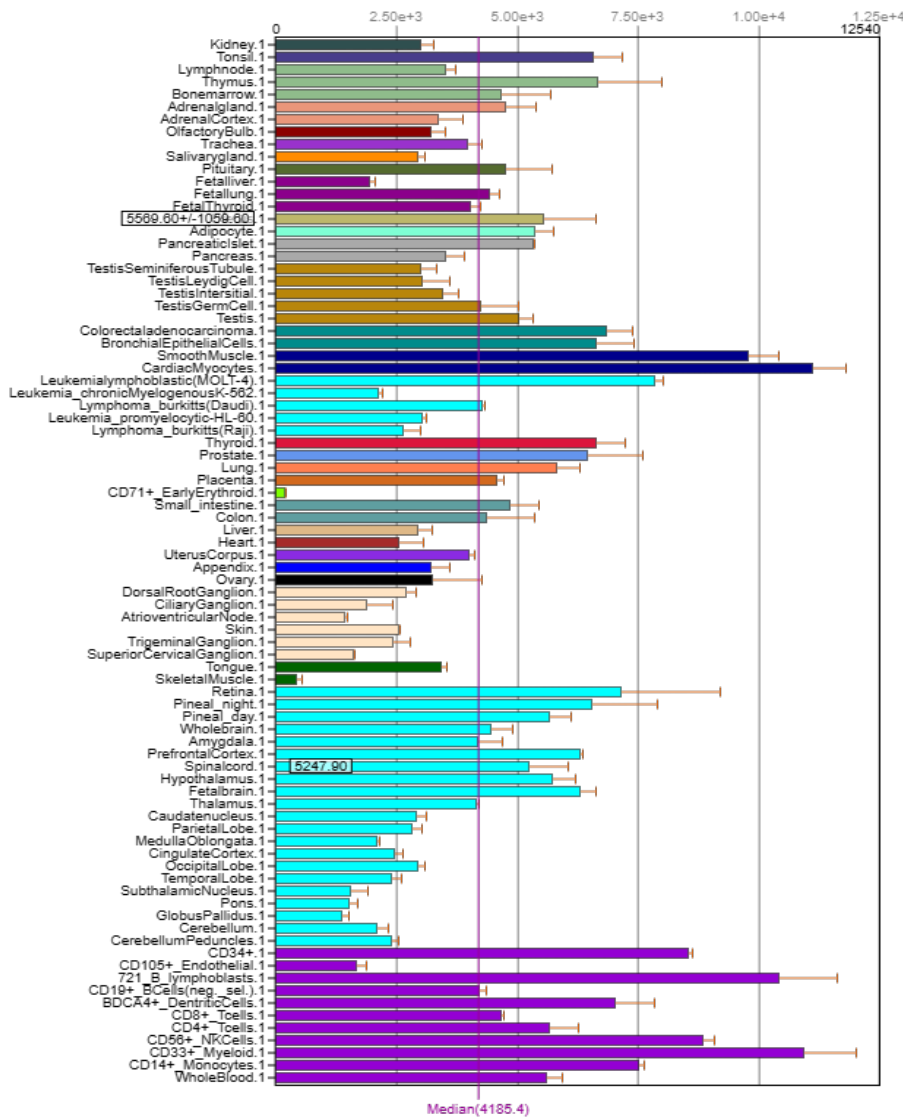


Figura 14: Expresión de β -actina en diferentes células y tejidos de Danio rerio adulto. Obtenido de BioGPS.

Como se puede observar en la **imagen 14**, el gen β -actina se expresa en prácticamente todos los tejidos del pez cebra, además las barras de la gráfica correspondientes para médula espinal se muestran por encima de la media considerada por el software.

Fz7b

De igual manera, se obtuvo el patrón de expresión del gen *frizzled 7b* (*Figura 15*). En la gráfica se observa una expresión en la médula espinal por encima de la media del programa para la expresión en diferentes tejidos marcada con una línea morada. Este gen debía presentar una expresión significativa en la médula ya que es el de interés de estudio y a diferencia del gen de control interno, se deseaba evaluar el comportamiento de expresión posterior a la lesión y durante el proceso de regeneración del calendario establecido, esperando encontrar variabilidad que demuestre si tiene o no participación en la regeneración. Los resultados de expresión de ARNm en pez cebra adultos en la figura 15 muestran que hay una expresión importante en comparación de la que muestran otros tejidos como el músculo esquelético (se muestra en la misma imagen), lo que lo hace buen candidato para la evaluación de la regeneración. Si este gen hubiera tenido una expresión baja, se tendría que haber considerado otro gen. De mostrarse una barra pequeña que indique un nivel de expresión poco estable, tampoco podría ser candidato para la evaluación; sin embargo, no fue el caso para *fz7b* en peces cebra adultos.

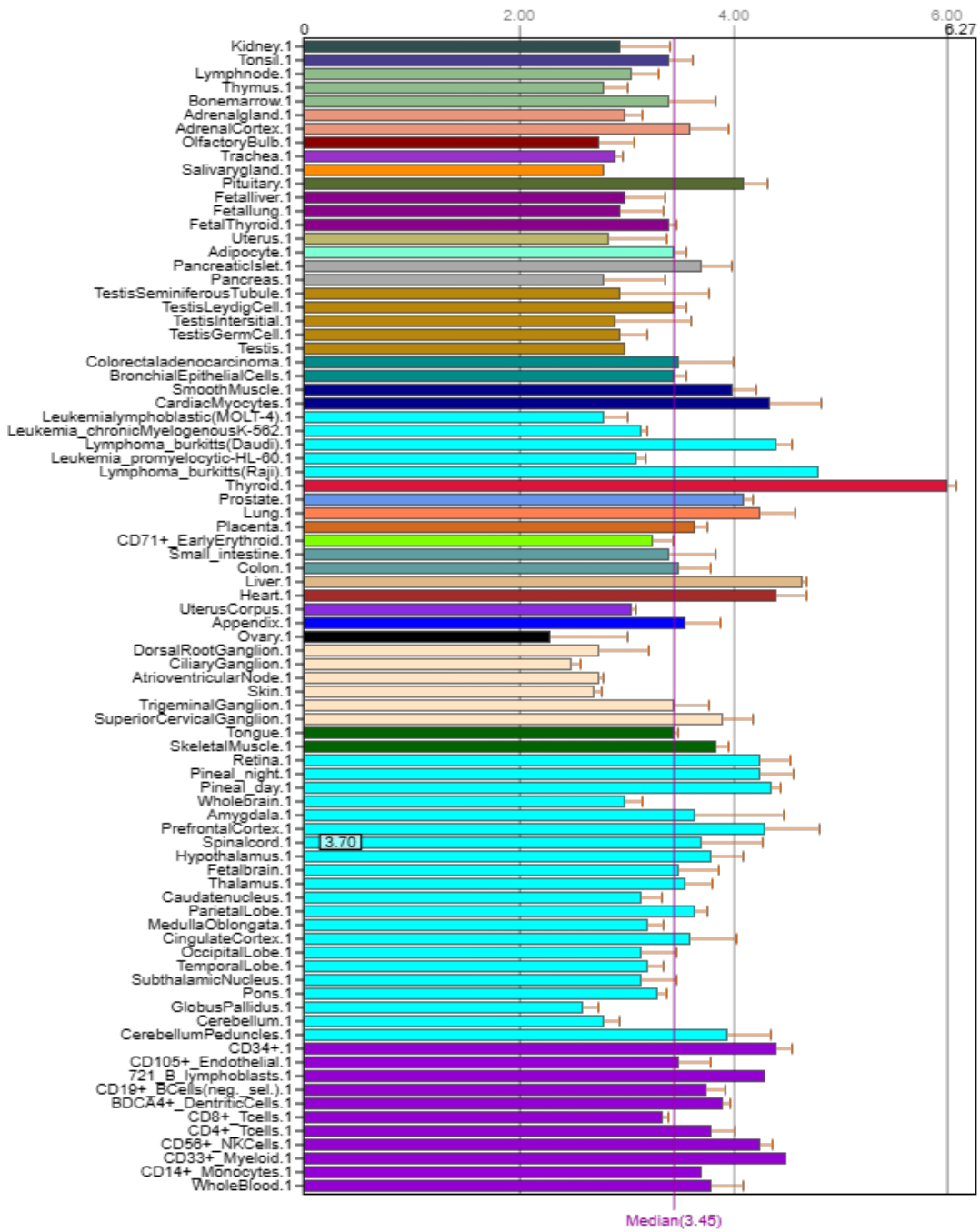


Figura 15: Expresión de *fz7b* en diferentes tejidos de pez cebra adulto. Obtenido de Bio GPS.

No se muestra la gráfica de expresión del gen *frizzled 7a* en Bio GPS debido a los resultados obtenidos de la expresión en diferentes estadios (Figura 10) en donde se observa que el gen es silenciado en etapa adulta en *Dario rerio*.

7.3 Lesión de médula espinal

Después de realizar la lesión, se colocó al pez en un tanque de recuperación (figura 16, inciso B). Se observó recuperación de movimiento parcial después de un promedio de 2 minutos para todos los peces lesionados. Los movimientos de los ejemplares únicamente fueron visibles en la zona anterior del cuerpo (de la lesión hacia la cabeza) con movimientos acelerados de los óperculos. Una lesión medular bien ejecutada fue visible con la incapacidad de movimiento en la cola. Después de 3 minutos, los peces permanecieron en el fondo del tanque. En la figura 1 se muestra la lesión con mayor detalle.

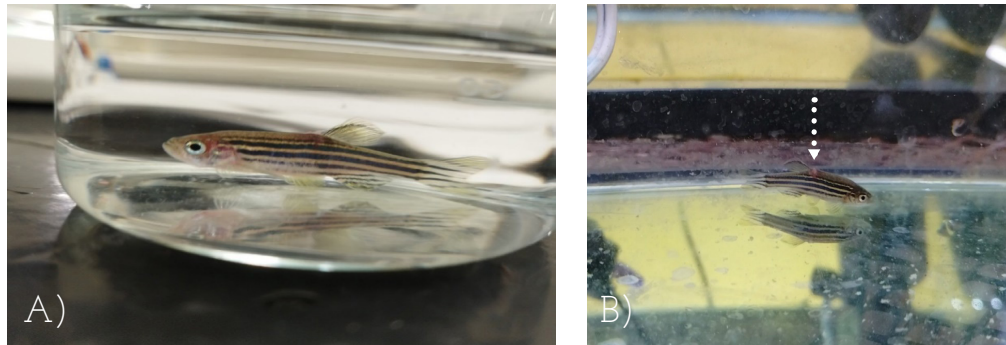


Figura 16: A) Pez cebra en agua con anestesia previo a la lesión. B) Pez cebra en tanque de recuperación. Se muestra la lesión con flecha blanca.



Figura 17: Pez cebra con médula espinal seccionada después de la lesión magnificación 10x. Se muestra la lesión con una flecha blanca.

Se repitió el mismo procedimiento de anestesia para aquellos peces que fueron lesionados únicamente en músculo sin hacer una lesión profunda que involucrara a la médula y/o que afectara el movimiento de la parte posterior del pez. La incisión se realizó en la misma posición que en los peces lesionados en médula espinal (Figura 18). En el caso del grupo de peces lesionados en músculo, se observó recuperación de nado aproximadamente tres minutos después de colocarse en recuperación. Si bien los movimientos de los óperculos eran acelerados como en el caso de los peces lesionados en médula, una vez transcurrida la recuperación, el pez pudo moverse sin dificultad y sin presentar complicaciones en el nado.

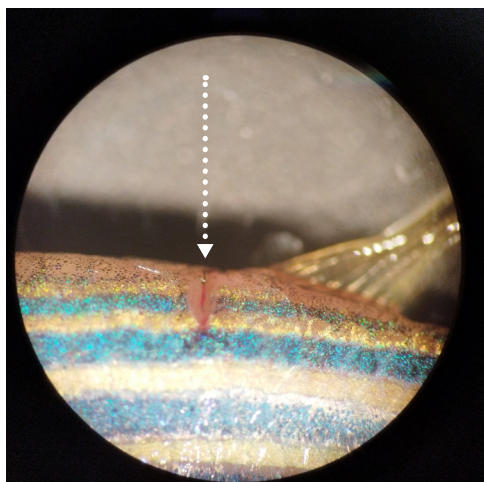


Figura 18: Lesión muscular en pez cebra adulto. Magnificación 10x

Posterior a la lesión, los peces se colocaron en peceras con agua estéril con las mismas condiciones de mantenimiento que el resto de la colonia.

Se siguió el cronograma marcado para evaluar la regeneración, monitoreando a los peces en la forma del nado.

7.4 Extracción de ARN

Tras sacrificar a los peces y pulverizar la zona de la lesión, se obtuvo un polvo blanquecino (figura 19) que al colocarse en los tubos con TRIzol comenzó a disgregarse.

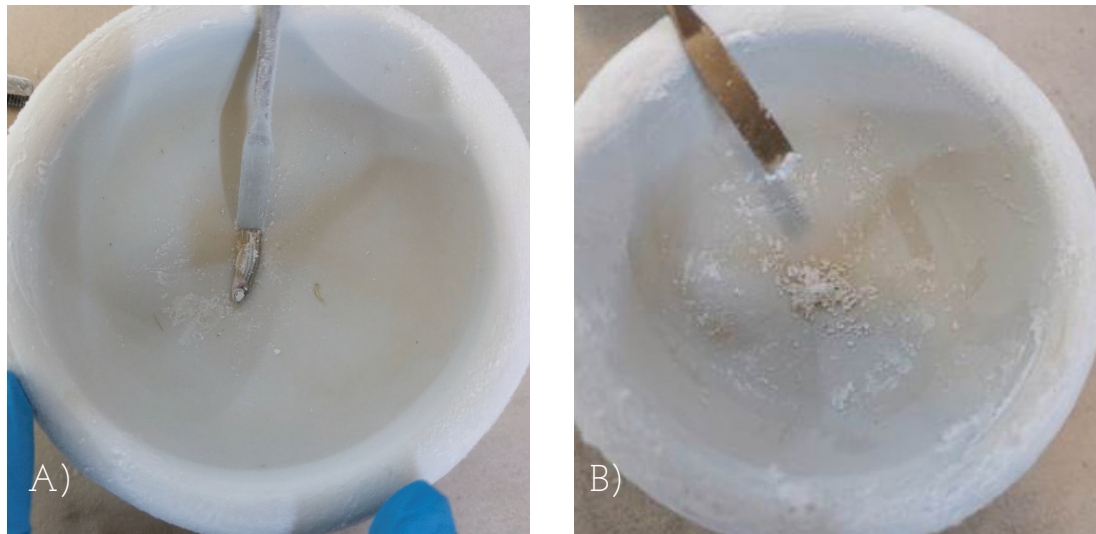


Figura 19: A) Corte de la zona de la lesión B) Tejido pulverizado.

En la figura 20 se muestra el resultado de la extracción de ARN siguiendo el método de Toni y colaboradores (2018). Se obtuvo una concentración de $527.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$ con un ratio 260/280, lo que muestra un valor dentro del rango óptimo para considerar que la muestra no está contaminada con presencia de proteínas, siendo el rango adecuado de 1.8- 2.1 de acuerdo con protocolos de control de calidad y pureza de muestras de ADN y RNA como el seguido por el Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN de la Universidad de Salamanca (2020). Por otro lado, el ratio 260/230 indica la pureza del ARN con respecto a las sustancias químicas usadas durante la extracción presentes en la muestra, este arrojó una medición de 2.20 considerándose un valor aceptable para ARN >1.5 . Se midió la pureza de todas las muestras terminado el proceso de extracción de RNA, los resultados se muestran en la tabla 7 con valores aceptables para la síntesis de ADNc.

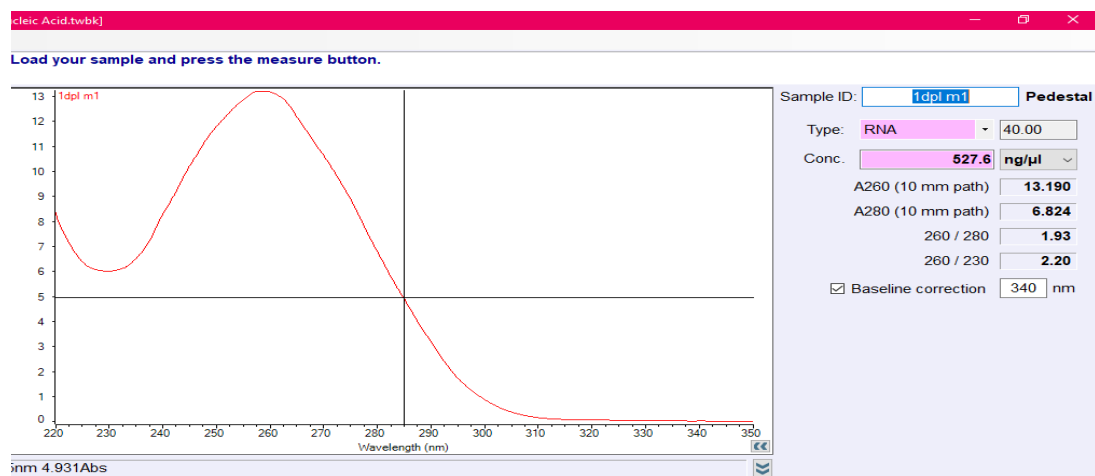


Figura 20: Medición de ARN con espectrofotómetro Nanodrop 2000. La muestra corresponde a peces con un dpl.

Tabla 7: Resultados de mediciones espectrofotométricas de todas las muestras empleadas.

Muestra	Concentración ng/μL	R a d i o 260/280	R a d i o 260/280
Control sin lesión (1)	403.9	1.89	2.03
Control sin lesión (2)	290.9	2.06	1.98
Control músculo (1)	178.4	2.14	2.00
Control músculo (2)	279.9	1.91	2.08
0 dpl (1)	186.9	1.99	1.89
0 dpl (2)	340.1	1.98	1.80
1 dpl (1)	527.6	1.74	2.05
1 dpl (2)	176.5	1.99	1.97
3 dpl (1)	334.3	1.92	2.00
3 dpl (2)	341.6	1.98	1.96
15 dpl (1)	283.9	1.99	1.81
15 dpl (2)	171.1	1.98	1.71
30 dpl (1)	101.1	1.96	2.1
30 dpl (2)	202.0	1.81	1.87

7.5 Estandarización de RT-PCR para β -actina y frizzled 7b

La temperatura óptima reportada para los oligonucleótidos para β -actina es de 56°C (Zou et al, 2019); para asegurar su funcionamiento, se realizó la evaluación en peces control, con un rango de temperaturas desde los 56°C hasta los 64°C y con una variación de 2°C entre cada temperatura, con la finalidad de observar en cuál de ellas había bandas más definidas y claras. Con esta información, se realizó una RT-PCR con el ciclado mostrado en la tabla 8.

Tabla 8: ciclado para RT-PCR de estandarización de β -actina con peces cebra control (sin lesión).

Paso	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	45 segundos	35 Ciclos
Alineamiento	56- 64°C	45 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	

Una vez terminada la reacción, los productos de la RT-PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa 2% con TBE y con un voltaje de 80v. Se observó el gel en el trasiluminador y se obtuvo una única banda en el carril correspondiente a 60°C (figura 21). La banda fue de un peso de 426 pb situada ligeramente por encima de la banda correspondiente a 400 pb en la escala de peso molecular. Los demás carriles se observan sin banda indicando que la alineación de oligonucleótidos a estas temperaturas no fue posible. Al observarse un producto inespecífico que se distingue como una banda difusa por debajo de la banda que corresponde el gen β -actina, se realizó una segunda reacción de RT-PCR para obtener un resultado más limpio.

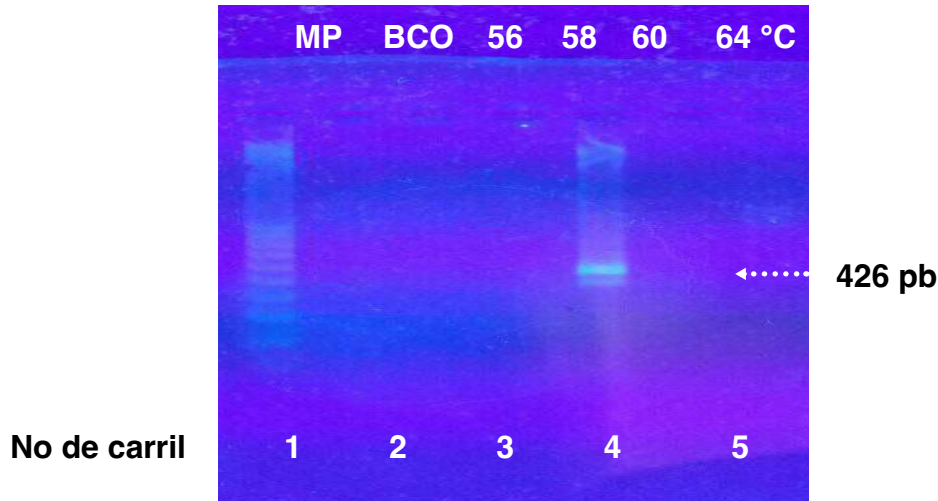


Figura 21: Gel de electroforesis de agarosa 2% para gradiente de temperatura de 56 a 64°C para la estandarización de β -actina.

La segunda reacción se realizó con un nuevo gradiente de temperatura de 60 a 63°C con un grado de diferencia entre cada uno. Las condiciones de ensamble fueron las mismas que la reacción anterior, así como el ciclado, cambiando la temperatura de alineación de acuerdo con el gradiente. Las condiciones de electroforesis fueron las mismas.

Se observaron 3 bandas en el gel (Figura 22), las 3 en un peso molecular correspondiente a los 426 pb. La primera se observó de forma casi imperceptible en el carril 4 (61°C), la segunda y la que tiene mayor grosor y brillo en el carril 5 (62 °C) y la tercera en el último carril (63 °C), esta última banda se observa nuevamente muy tenue y con menos tamaño que la anterior.

A pesar de que se ve una banda inespecífica cercana a los 180 pb en el carril de la banda de mayor tamaño y brillo, se tomó esta temperatura de alineamiento para los oligonucleótidos debido al tamaño de la banda. Si bien las tres bandas de los 3 carriles se encuentran en el peso molecular esperado, la correspondiente a los 62 °C es la que indica un mayor aprovechamiento de los oligonucleótidos en la reacción con un producto más visible en la electro-

foresis. El motivo por el cuál no se repitió el ensayo para corroborar nuevamente la presencia de una banda a una temperatura de 60°C como la obtenida en el primer gel fue debido a la dosificación de reactivos y ejemplares de peces para el resto del cronograma de trabajo ya que el termociclador usado en el laboratorio presentaba gradientes de temperatura demasiado altos en algunas ocasiones provocando que la muestra se perdiera por completo y haciendo imposible su análisis

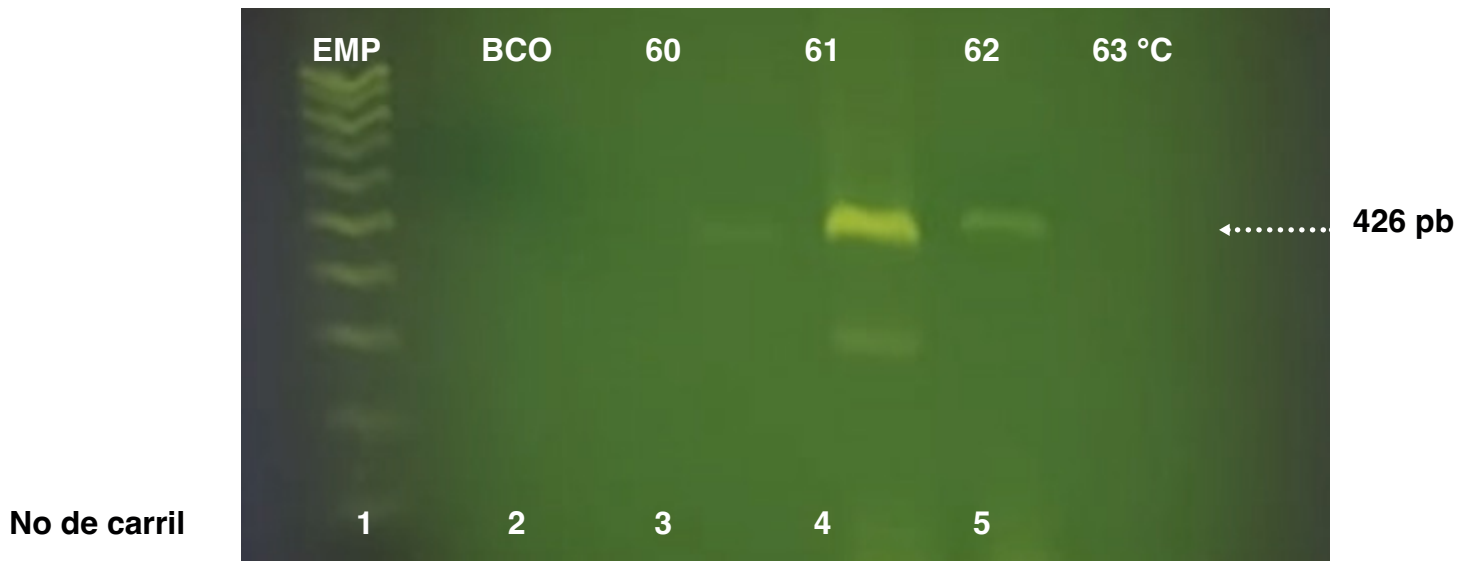


Figura 22: Gel de electroforesis de agarosa 2% para nuevo gradiente de temperatura de 60 a 63°C para β -actina.

Al igual que con β -actina, se realizó una estandarización de la temperatura óptima para el alineamiento correcto de los oligonucleótidos correspondientes a fz7b partiendo de lo reportado por Ungar y Calvey (2002) quienes indican una temperatura de 58°C. Se realizó una rampa de temperatura con rangos de 56°C a 64°C.

El ensamble de reacción se menciona en la tabla seis y el ciclado de la misma en la tabla 9.

Tabla 9: ciclado para RT-PCR de estandarización de fz7b con peces cebra control (sin lesión).

Paso	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	45 segundos	35 Ciclos
Alineamiento	56- 64°C	45 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	

Se usó un gel de agarosa al 2% con TBE para ver los productos de la RT-PCR para fz7b. Se observaron 2 bandas como resultado de la electroforesis (Figura 23), una correspondiente a la temperatura de alineamiento de 56°C y una de mayor tamaño e intensidad de brillo en el carril correspondiente a una temperatura de 60 °C, al ver que la banda a esta temperatura fue de mayor grosor, también se tomó el rango de temperatura a partir de este resultado para buscar una mayor especificidad de alineamiento. Nuevamente no se obtuvo el resultado esperado en la temperatura reportada de 58°C, no se puede descartar que haya sido por fallas observadas en el equipo utilizado.

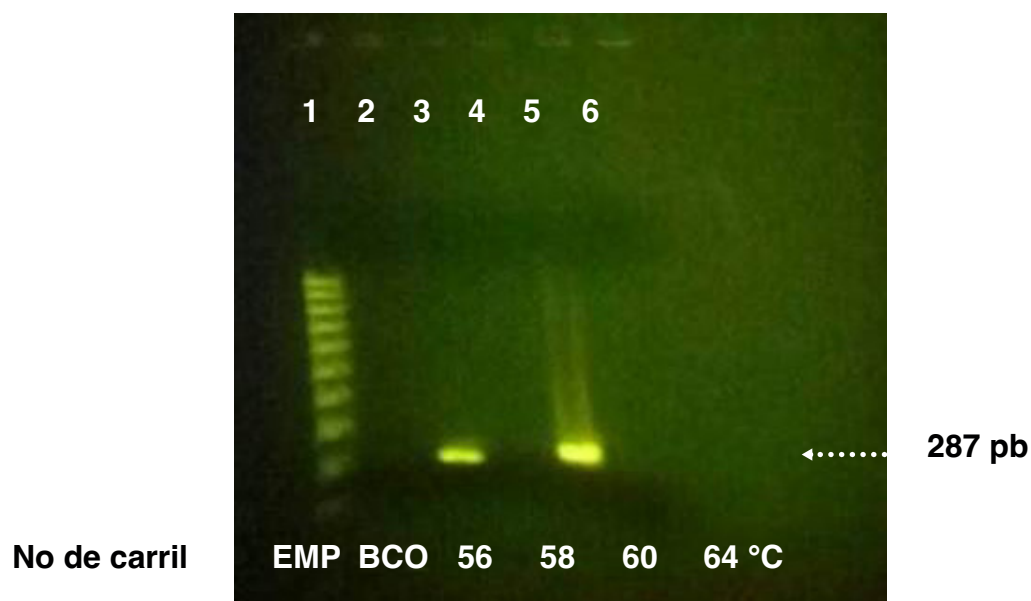


Figura 23: Gel de electroforesis de agarosa 2% para gradiente de temperatura de 56 a 64°C para la estandarización de fz7b en adultos del pez cebra.

El nuevo gradiente de temperatura fue contemplando las temperaturas de 55, 56, 57, 59, 60 y 61°C, la temperatura de 58°C se descartó debido a que no se observó banda en el carril correspondiente a esta temperatura en el gel de la figura 23. El ciclado y las condiciones de ensamble de reacción fueron las mismas ya mencionadas para este gen.

En este gel de electroforesis se observaron bandas de amplificación para todas las temperaturas de alineamiento (Figura 24), todas ellas en un peso correspondiente a 287 pb con excepción de la última banda que se observa ligeramente por encima de las demás(61°C). Por lo anterior, se tomó la decisión de usar la temperatura de alineamiento de 56°C (carril 4) ya que se observó con un buen brillo, grosor y definición en los bordes.

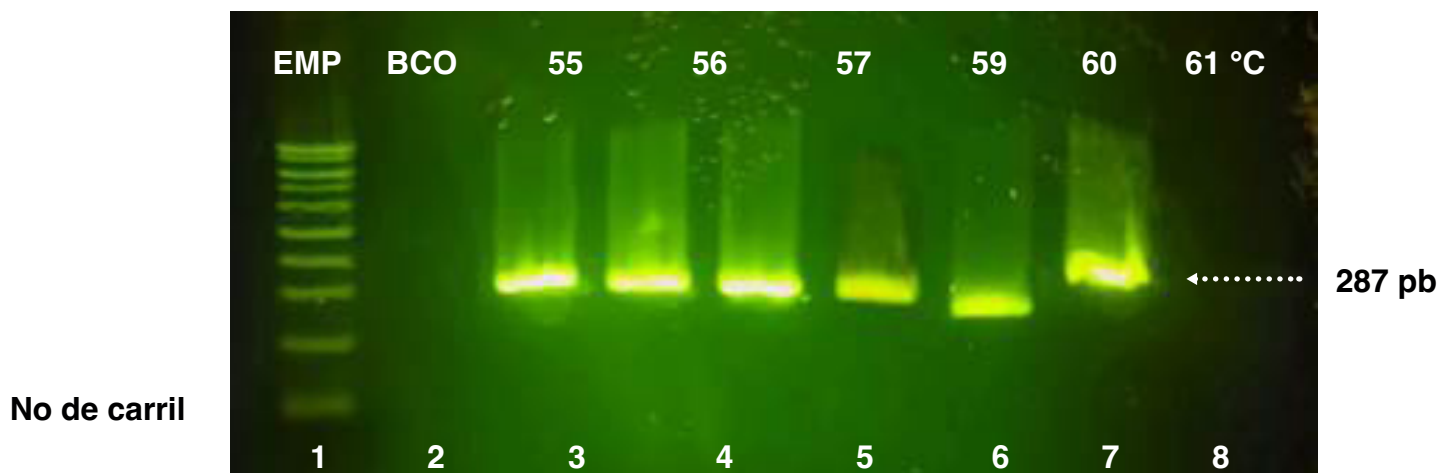


Figura 24: Gel de electroforesis de agarosa 2% nuevo gradiente de temperatura de 55 a 61°C para la estandarización de fz7b para pez cebra adulto.

7.6 Evaluación de la expresión del gen fz7b durante la regeneración de médula espinal de pez cebra adulto

Una vez validadas y estandarizadas las condiciones de los dos pares de oligonucleótidos, se realizó la evaluación de la expresión de fz7b en los periodos de 0, 1, 3, 15 y 30 dpl para observar la expresión del gen durante la regeneración de la médula espinal en este periodo, para ello se repitió el método de lesión en los diferentes grupos del peces cebra, el experimento se realizó por duplicado para asegurar una obtención de resultados similares y con ello poder brindar un resultado más sólido. La decisión de realizar el experimen-

to únicamente por duplicado fue debido a cuestiones bioéticas tomando en cuenta el factor de la cantidad de ejemplares utilizados para cada una de las repeticiones. Una vez cumplido el plazo indicado en el cronograma (tabla 3), se realizó el sacrificio, extracción de ARN, y obtención de ADNc justo como se describió para el grupo control usado en la estandarización. Para el gel correspondiente a B-actina (Figura 25), se observan bandas en un peso molecular de 426 pb, cumpliendo con el tamaño de amplicón esperado en todas las muestras de acuerdo con lo obtenido en los resultados de primer- BLAST. Del lado derecho de la figura, se muestra el gel para fz7b, en este se puede apreciar nuevamente que las bandas están en un peso deseado de 287 pb en todas las muestras. A simple vista, se destacan los carriles que contienen muestras de peces con 3 y 15 días post-lesión respectivamente (carriles 7 y 8).

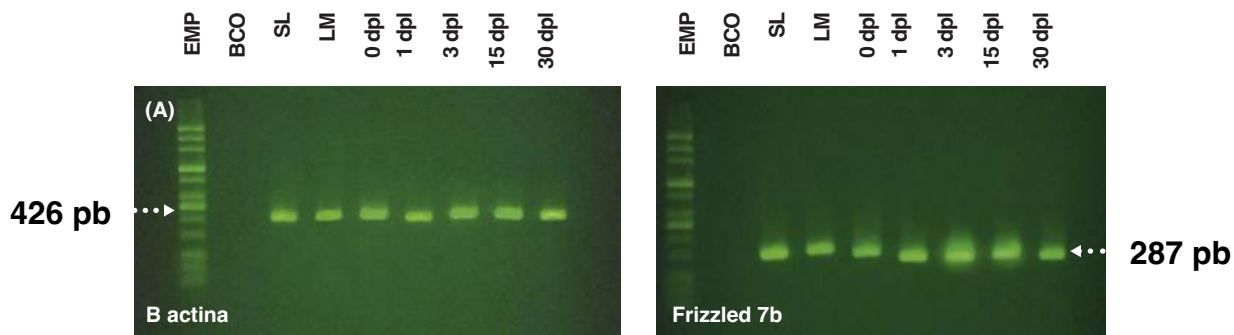


Figura 25: A) Gel de agarosa 2% para la evaluación de la expresión de β -actina usado como control interno para todos los grupos de peces usados. B) Gel de agarosa 2% para la evaluación de la expresión del gen fz7b en diferentes momentos de la regeneración de médula espinal.

Al realizar la repetición del experimento para confirmar resultados, se observaron bandas en los pesos moleculares correctos para ambos genes (Figura 26). El orden de carga fue el mismo que en el gel anterior. En el gel para fz7b, se observa un patrón de expresión similar con el primer resultado, con una aparente expresión diferente para las bandas de los carriles 7 y 8.

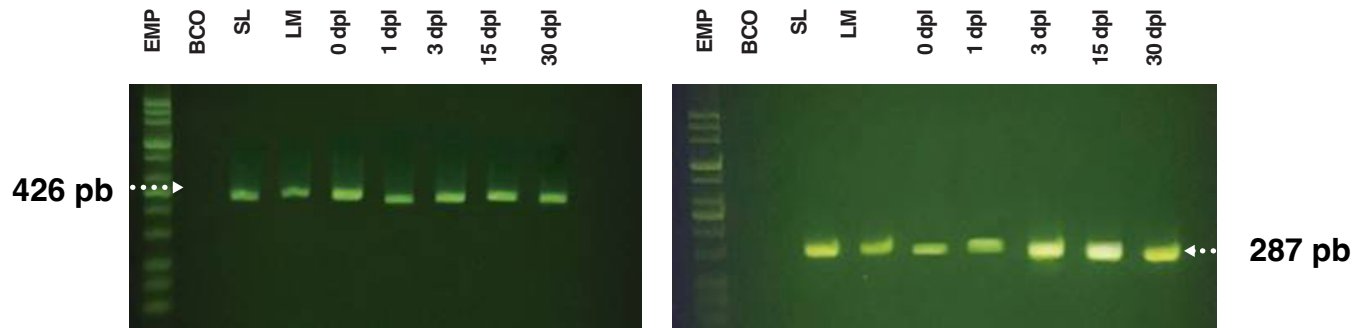


Figura 26: A) Gel de agarosa 2% para repetición para la evaluación de la expresión de β -actina usado como control interno para todos los tratamientos de peces usados. B) Gel de agarosa 2% de repetición para la evaluación de la expresión del gen fz7b en diferentes momentos de la regeneración de médula espinal en adultos del pez cebra.

7.7 Análisis de geles con ImageJ

Se realizó un análisis con el software para tener un número real de la expresión de los geles en cada uno de sus carriles, para ello se tomó en cuenta el promedio del valor de grises detectado en la foto del gel. Posteriormente de obtener los resultados del software, se normalizaron las repeticiones 1 y 2 con sus respectivos valores obtenidos dando como resultado lo siguiente:

Primer ensayo

β -actina

	Mean	Min	Max		Mean	Min	Max
1	86.333	57	139	1	87.043	45	125
2	84.120	58	126	2	81.634	48	118
3	88.298	62	127	3	83.687	46	121
4	88.015	62	139	4	87.953	47	124
5	91.623	62	128	5	101.001	59	139
6	89.919	59	133	6	94.363	53	135
7	83.938	52	155	7	77.202	41	117

Tabla 10: Valores normalizados para primer ensayo con % de expresión

Carril	Normalizando los datos	% de expresión de fz7b
Blanco	---	---
1 (Pez control sin lesión)	1.008	100%
2 (Lesión en músculo)	0.970	96.23%
3 (0 días post lesión)	0.947	93.94%
4 (1 día post-lesión)	0.999	99.10%
5 (3 días post-lesión)	1.102	109.32%
6 (15 días post- lesión)	1.049	104.06%
7 (30 días post-lesión)	0.919	91.17%

Repetición

β -actina

	Mean	Min	Max		Mean	Min	Max
1	62.755	31	115	1	87.354	55	169
2	58.544	32	107	2	81.478	58	141
3	79.773	32	140	3	80.499	61	155
4	62.513	31	116	4	85.199	61	156
5	71.627	31	137	5	108.765	61	207
6	72.544	33	144	6	110.879	55	217
7	64.217	30	121	7	91.948	53	177

Tabla 11 Valores normalizados para repetición de ensayo con % de expresión

Carril	Normalizando	% de expresión de fz7b
Blanco	---	---
1 (Pez control sin lesión)	1.391	100%
2 (Lesión en músculo)	1.391	100%
3 (0 días post lesión)	1.009	72.53%
4 (1 día post-lesión)	1.362	97.91%
5 (3 días post-lesión)	1.518	109.13%

6 (15 días post- lesión)	1.528	109.84%
7 (30 días post-lesión)	1.431	102.87%

Estos datos confirman que a los 3 y 15 días post-lesión medular existe un ligero incremento en la expresión de fz7b siendo de 9.32% mayor con respecto al control para el caso de la evaluación a los 3 dpl y de un 4.06% mayor para el día 15 tras la lesión en el primer estudio (tabla 10). Para el caso de los peces lesionados en músculo, se tiene un porcentaje de expresión de 96.23% para el gen fz7b con respecto al control β -actina. Por otro lado, en los periodos de 0 y 1 día post- lesión se observan porcentajes de expresión por debajo del 100% posiblemente por qué la participación que se sugiere del gen fz7b ocurre en periodos más avanzados durante el proceso de la regeneración, mientras que, en etapas tempranas de la reparación de la lesión podrían estar interactuando otras vías, genes y mecanismos encargados de la respuesta primaria de daño ya que la vía de señalización que involucra al gen fz7b no es un único proceso molecular el que tiene lugar en el proceso fisiológico de la recuperación total en la médula del pez y en el trabajo realizado únicamente se evaluó uno de muchos genes que participan. Un ejemplo de estas posibles vías es la de la señalización fgf (Factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés). Esta vía es esencial para la modulación celular glial después de una lesión, pues la regulación de células gliales permite la morfogénesis y la formación del puente glial para la reconexión y regeneración axonal, así como la proliferación celular y la migración de nuevas células (Goldshmit et al., 2012).

Otro gen importante en el proceso de reconexión axonal en pez cebra es el L1.1, encargado de la transcripción de una proteína de membrana con el mismo nombre. En mamíferos, esta proteína tiene un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central y en los procesos de plasticidad neuronal, así como en el crecimiento de los axones. Para el caso de pez cebra, existen dos homólogos de este gen: L1.1 y L1.2 siendo el primero el más relevante para la recuperación de conexiones axonales en la regeneración (C. G. Becker *et al.*, 2004).

En la repetición del ensayo se obtuvieron resultados similares (tabla 11). Se destaca una expresión de un 100% para el caso de los peces control y los peces con lesión muscular, lo que podría indicar que la lesión muscular no es suficiente para activar la sobreexpresión de fz7b, sin embargo, una vez trans-

curridos 3 días se observa un valor de expresión de fz7b de 9.13% mayor con respecto al control y de 9.84% para la evaluación de 15 dpl.

Estos resultados sugieren que fz7b podría estar relacionado con los procesos involucrados en la regeneración de la médula espinal y la recuperación total de funciones y movimiento en el pez cebra adulto. Así mismo, se obtuvo un valor de 91.17% de expresión a los 30 días post- lesión para el primer ensayo y un valor de 102.87% para la repetición lo que podría indicar una posible regulación en la expresión del gen una vez terminado el proceso de regeneración llegando probablemente a un estado “basal” siendo un porcentaje similar o cercano al del control.

El posible incremento obtenido a 3 y 15 dpl para la expresión de fz7b, podría indicar que existe una participación de este en la regeneración en el pez cebra al incrementar la expresión del gen con respecto al gen β -actina tomado como control interno. Este aumento se traduce en una mayor cantidad del receptor membranal fz, lo que aumenta la traducción de señales dependientes de ligandos Wnt, mismos que activan cascada abajo la señal para la traducción de más genes dependientes de β -catenina. Puede existir además una unión de correceptores Wnt que activen más vías de señalización y que participen en procesos como reordenamiento de citoesqueleto, que conlleva a la migración de células, posiblemente oligodendrocitos o inclusive células madre neurales que permitan la reparación en la zona de daño. Por otro lado, es posible que en los días que no se observa una alteración aparente en la expresión del gen (0 y 1 dpl), el mecanismo celular esté priorizando procesos de depuración de los restos neuronales y disminuyendo los procesos de inflamación, para dar paso a la regeneración una vez que se logre un ambiente celular adecuado.

7.8 Evaluación de movimiento durante la regeneración

Debido a que las técnicas moleculares utilizadas para la evaluación de la regeneración únicamente tenían el fin de evaluar la expresión de genes en diferentes momentos, no fue posible realizar la evaluación de la reconexión axonal de forma directa, contrario a esto se realizó una evaluación indirecta observándose la evolución progresiva en la capacidad natatoria de los ejemplares evaluados; el motivo por el cual no se realizó una evaluación directa de la reconexión fue debido a la decisión de no lastimar a los ejemplares en

proceso de recuperación, ya que para observar la formación del puente axonal en la médula, debía atravesarse el tejido circundante y esto podría resultar en la alteración del proceso de curación y regeneración de la herida con la posibilidad de modificar los resultados de la expresión del gen o incluso, comprometiendo la vida del ejemplar.

De la evaluación en el nado de los peces se puede destacar que el primer día post-lesión medular, todos los peces se situaron en el fondo de la pecera evitando cualquier movimiento debido a la pérdida de conexión de tejido. Aunado a lo anterior, se observó un mayor movimiento de los opérculos y signos de estabilidad después de la anestesia reflejándose en intentos de nado y una recuperación de la velocidad de respiración que fue disminuyendo con los minutos pasando de ser frenética a estable y constante.

Transcurridos 3 días post-lesión, se observó a los peces nadando hacia la superficie; sin embargo, fue claro que el pedúnculo caudal carecía de movimiento, notándose la aleta caudal caída y los peces la mayor parte del tiempo lo pasaron en el fondo de la pecera.

Pasados 15 días tras la lesión, el pez fue recuperando la movilidad de la aleta caudal, además que esta ya no se observaba caída. Finalmente, transcurridos los 30 días post-lesión, el pez nadaba completamente hacia la superficie, observando movimiento completo de la parte posterior del cuerpo.

8 Conclusiones

Se estableció la colonia de peces cebra y las condiciones para el mantenimiento y manejo óptimo en el LABIMODE, pues no se contaba con una colonia.

En la parte molecular, se amplificaron con éxito los dos pares de oligonucleótidos mediante la estandarización de la RT-PCR que permitió la amplificación del gen permitiendo observar tamaños de amplicón que coincidieron con la literatura y las herramientas bioinformáticas para ambos genes. Además, se implementó una técnica segura y eficiente para el manejo y extracción de RNA de tejidos mediante el uso de nitrógeno líquido con las herramientas disponibles en la facultad de Ciencias de la UAEMéx. El resultado más importante fue el obtenido en el análisis de la expresión del gen *fz7b* que muestra un ligero aumento cercano a un 10% mayor con respecto al control β -actina en periodos de 3 y 15 días post-lesión medular, para después llegar a una estabilización una vez regenerada la médula por completo (30 dpl), por otro lado, no se observó expresión distinta al control de peces no lesionados a los 0 y 1 dpl.

En lo que a la recuperación de los peces se refiere, fue posible evaluar el proceso completo de la restauración de médula espinal gracias a una correcta ejecución de la lesión medular, ya que de haberse realizado de forma no adecuada los ejemplares habrían muerto o no tendrían una capacidad natatoria posterior a la recuperación; por el contrario, se logró la recuperación total de los animales mostrado por una capacidad de nado normal.

Por último, es importante mencionar que no fue posible evaluar la reconexión axonal directamente debido a la regeneración del tejido circundante a la lesión, en su lugar se observó de forma indirecta.

Los resultados de recuperación total de movimiento y a escala molecular tras una lesión medular en el pez cebra adulto, tienen relevancia para investigaciones futuras en el campo de regeneración que podrían ser útiles para posibles terapias en mamíferos que no tienen la capacidad regenerativa.

9 Trabajo a futuro

Se sugiere ampliar el tiempo de evaluación del gen fz7b en la regeneración pues ya se conoce en qué punto se observa una mayor expresión del gen. El ampliar las observaciones a días más cercanos a los 3 y 15 dpl, podrá brindar más información sobre su expresión, así como el momento en el que se llega a un estado basal del gen.

De igual forma, se propone fortalecer este estudio con otra técnica molecular que permita una mejor evaluación de la regeneración axonal en la zona, misma que sea más específica; por ejemplo, inmunofluorescencia, ya que en este trabajo solo se evaluó la recuperación de movimiento. A pesar de que los resultados son significativos, otra técnica podría indicar el comportamiento de la zona lesionada a microescala.

Por último, se recomienda la búsqueda de colaboraciones con institutos o laboratorios que puedan complementar el trabajo y robustecerlo con diferentes técnicas, así como proporcionar experiencia en cuanto al manejo y experimentación previa con *Danio rerio*.

Anexos

Se incluyen los vídeos de la evaluación de la conducta de los peces en diferentes momentos post- lesión de médula espinal en la siguiente liga:

<https://drive.google.com/drive/folders/1Z298IezUxRg44Bkl5P66kpwYZT-daweMN?usp=sharing>

Referencias

- Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2022). *Molecular Biology of the Cell: Seventh International Student Edition with Registration Card*. WW Norton & Company.
- Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019a). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00282>
- Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019b). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00282>
- Allbutt, H. N., Siddall, P. J., & Keay, K. A. (2007). Contusive spinal cord injury evokes localized changes in NADPH-d activity but extensive changes in Fos-like immunoreactivity in the rat. *Journal of Anatomy*, 211(3), 352–370. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7580.2007.00765.X>
- Amal, H., Gong, G., Gjoneska, E., Lewis, S. M., Wishnok, J. S., Tsai, L. H., & Tannenbaum, S. R. (2019). S-nitrosylation of E3 ubiquitin-protein ligase RNF213 alters non-canonical Wnt/Ca²⁺ signaling in the P301S mouse model of tauopathy. *Translational Psychiatry*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41398-019-0388-7>
- Andrés-Cano, P., Andrés-García, J. A., & Álvarez-Galovich, L. (2015). [Corticosteroid therapy for acute spinal cord injury: the NASCIS controversy]. *Revista Espanola de Cirugia Ortopedica y Traumatologia*, 59(1), 69–70. <https://doi.org/10.1016/J.RECOT.2014.06.003>
- Antos, C. L., Knopf, F., & Brand, M. (2016). Regeneration of Organs and Appendages in Zebrafish: A Window into Underlying Control Mechanisms. *ELS*, 1–17. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0022101>
- Au, K. S., Ashley-Koch, A., & Northrup, H. (2010). Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16(1), 6–15. <https://doi.org/10.1002/DDRR.93>
- Bachman, J. (2013). Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*, 530, 67–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
- Badner, A., Siddiqui, A. M., & Fehlings, M. G. (2017). Spinal cord injuries: how could cell therapy help? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(5),

529–541. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1308481>

Bai, S., Zhang, M., Huang, X., Zhang, X., Lu, C., Song, J., & Yang, H. (2021). A bioinspired mineral-organic composite hydrogel as a self-healable and mechanically robust bone graft for promoting bone regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 413, 127512. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.127512>

Beard, J. L., Connor, J. R., & Jones, B. C. (1993). Iron in the brain. *Nutrition Reviews*, 51(6), 157–170. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.1993.TB03096.X>

Becker, C. G., Lieberoth, B. C., Morellini, F., Feldner, J., Becker, T., & Schachner, M. (2004a). L1.1 is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7837–7842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2420-04.2004>

Becker, C. G., Lieberoth, B. C., Morellini, F., Feldner, J., Becker, T., & Schachner, M. (2004b). L1.1 is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(36), 7837–7842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2420-04.2004>

Becker, T., Bernhardt, R. R., Reinhard, E., Wullimann, M. F., Tongiorgi, E., & Schachner, M. (1998). Readiness of zebrafish brain neurons to regenerate a spinal axon correlates with differential expression of specific cell recognition molecules. *The 55 Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(15), 5789–5803. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-15-05789.1998>

Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 330(9), 585–591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300901>

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J., & Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382(6588), 225–231. <https://doi.org/10.1038/382225A0>

Bican, O., Minagar, A., & Pruitt, A. A. (2013a). The Spinal Cord. *Neurologic Clinics*, 31(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2012.09.009>

Bican, O., Minagar, A., & Pruitt, A. A. (2013b). The Spinal Cord. A Review of

Functional Neuroanatomy. In *Neurologic Clinics* (Vol. 31, Issue 1, pp. 1–18). <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2012.09.009>

Bovolenta, P., Wandosell, F., & Nieto-Sampedro, M. (1993). Characterization of a Neurite Outgrowth Inhibitor Expressed After CNS Injury. *European Journal of Neuroscience*, 5(5), 454–465. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.1993.TB00512.X> Briona, L. K., Poulain, F. E., Mosimann, C., & Dorsky, R. I. (2015). Wnt/ β -catenin signaling is required for radial glial neurogenesis following spinal cord injury. *Developmental Biology*, 403(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2015.03.025>

Brownlie, A., Donovan, A., Pratt, S. J., Paw, B. H., Oates, A. C., Brugnara, C., Witkowska, H. E., Sassa, S., & Zon, L. I. (1998). Positional cloning of the zebrafish *sauternes* gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nature Genetics*, 20(3), 244–250. <https://doi.org/10.1038/3049>

Canning, D. R., Höke, A., Malemud, C. J., & Silver, J. (1996). A potent inhibitor of neurite outgrowth that predominates in the extracellular matrix of reactive astrocytes. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the 56 International Society for Developmental Neuroscience*, 14(3), 153–175. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(96\)00004-4](https://doi.org/10.1016/0736-5748(96)00004-4)

Casadei, R., Pelleri, M. C., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Canaider, S., Strippoli, P., & Frabetti, F. (2011). Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 11(3–4), 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2011.01.003>

Castro-Rodríguez, E., Azagra, R., Gómez-Batiste, X., & Povedano, M. (2021). La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) desde la Atención Primaria. *Epidemiología y características clínico-asistenciales. Atención Primaria*, 53(10), 102158. <https://doi.org/10.1016/J.APRIM.2021.102158>

Chacón, S. C., & Nieto-Sampedro, M. (n.d.-a). Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de literatura Pathophysiology of spinal cord injury. A review Palabras clave: LESIÓN MEDULAR, MUERTE NEURONAL PRIMARIA, MUERTE NEURONAL SECUNDARIA, REGENERACIÓN NERVIOSA, ISQUEMIA, TRASPLANTES CELULARES, ASTROCITOS REACTIVOS. *Vet. Méx*, 36(1), 2005.

Chacón, S. C., & Nieto-Sampedro, M. (n.d.-b). Fisiopatología de la lesión medular. Revisión de literatura Pathophysiology of spinal cord injury. A re-

view Palabras clave: LESIÓN MEDULAR, MUERTE NEURONAL PRIMARIA, MUERTE NEURONAL SECUNDARIA, REGENERACIÓN NERVIOSA, ISQUEMIA, TRASPLANTES CELULARES, ASTROCITOS REACTIVOS. *Vet. Méx*, 36(1), 2005.

Cho, T. A. (2015). Spinal cord functional anatomy. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, 21, 13–35. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000461082.25876.4A>

Cigliola, V., Becker, C. J., & Poss, K. D. (2020). Building bridges, not walls: spinal cord regeneration in zebrafish. *Disease Models & Mechanisms*, 13(5). <https://doi.org/10.1242/DMM.044131>

Daniela, D., Peralta, S., & Bolgiani, P. A. (n.d.). VOLUMEN 32-No 2 2022-REVISTA ARGENTINA DE QUEMADURAS The future in the treatment of skin injured by burns. Retrieved October 1, 2023, from <https://www.actasdermo.org/es-nuevos-modelos-experimentales-el-57>

De, A. (2011). Wnt/Ca² signaling pathway: A brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(10), 745–756. <https://doi.org/10.1093/ABBS/GMR079>

Derderian, C., Shumway, K. R., & Tadi, P. (2023). Physiology, Withdrawal Response. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544292/>

Diaz Quiroz, J. F., & Echeverri, K. (2013). Spinal cord regeneration: where fish, frogs and salamanders lead the way, can we follow? *Biochemical Journal*, 451(3), 353–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20121807>

Djiane, A., Riou, J. F., Umbhauer, M., Boucaut, J. C., & Shi, D. L. (2000). Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development (Cambridge, England)*, 127(14), 3091–3100. <https://doi.org/10.1242/DEV.127.14.3091>

Druschel, C., Schaser, K. D., & Schwab, J. M. (2013). Current practice of methylprednisolone administration for acute spinal cord injury in Germany: a national survey. *Spine*, 38(11). <https://doi.org/10.1097/BRS.0B013E31828E4DCE>

Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., & Dumont, A. S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, 24(5), 254–264. <https://doi.org/10.1097/00002826-200109000-00002>

Eckert, M. J., & Martin, M. J. (2017). Trauma: Spinal Cord Injury. In *Surgical Clinics of North America* (Vol. 97, Issue 5, pp. 1031–1045). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.06.008>

Ellison, J. A., Velier, J. J., Spera, P., Jonak, Z. L., Wang, X., Barone, F. C., & Feuerstein, G. Z. (1998). Osteopontin and its integrin receptor alpha(v)beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. *Stroke*, 29(8), 1698–1707. <https://doi.org/10.1161/01.STR.29.8.1698>

El-Messaoudi, S., & Renucci, A. (2001a). Expression pattern of the frizzled 7 gene during zebrafish embryonic development. *Mechanisms of Development*, 102(1–2), 231– 234. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00291-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00291-X) 58

El-Messaoudi, S., & Renucci, A. (2001b). Expression pattern of the frizzled 7 gene during zebrafish embryonic development. *Mechanisms of Development*, 102(1–2), 231– 234. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00291-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00291-X)

Estrada-Mondaca, S., Carreón-Rodríguez, A., Parra-Cid, M. D. C., Ibarra-Ponce De León, C., Velasquillo-Martínez, C., Vacanti, C. A., & Belkind-Gerson, J. (2007). [Spinal cord injury and regenerative medicine]. *Salud Publica de Mexico*, 49(6), 437– 444. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342007000600011>

Fan, B., Wei, Z., Yao, X., Shi, G., Cheng, X., Zhou, X., Zhou, H., Ning, G., Kong, X., &

Feng, S. (2018). Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, 27(6), 853. <https://doi.org/10.1177/0963689718755778>

Fang, P., Lin, J. F., Pan, H. C., Shen, Y. Q., & Schachner, M. (2012). A Surgery Protocol for Adult Zebrafish Spinal Cord Injury. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(9), 481–487. <https://doi.org/10.1016/J.JGG.2012.07.010>

Fernando, W., Ramírez, M., Arley, H., & Santana, F. (2007). DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN ELECTROESTIMULADOR POR ACUPUNTURA PARA LA REHABILITACIÓN DE PACIENTES DISCAPACITADOS.

Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2), 63–71. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>

Fishman, M. C. (2001). Zebrafish - The canonical vertebrate. *Science*, 294(5545), 1290– 1291. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1066652>

Foust, K. D., Wang, X., McGovern, V. L., Braun, L., Bevan, A. K., Haidet, A. M., Le, T. T., Morales, P. R., Rich, M. M., Burghes, A. H. M., & Kaspar, B. K. (2010). Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nature Biotechnology*, 28(3), 271–274. <https://doi.org/10.1038/NBT.1610> 59

Galetta, K. M., & Bhattacharyya, S. (2019). Multiple Sclerosis and Autoimmune Neurology of the Central Nervous System. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 325–336. <https://doi.org/10.1016/J.MCNA.2018.10.004>

Gálvez-Navas, J. M., Pérez-Ramírez, C., Ramírez-Tortosa, M. C., Gálvez-Navas, J. M., Pérez-Ramírez, C., & Ramírez-Tortosa, M. C. (2021). Secreted Frizzled - related Protein 4 and breast cancer. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 62(4), 438–450. <https://doi.org/10.30827/ARS.V62I4.21740>

Gao, C., & Chen, Y. G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22(5), 717–727. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2009.11.021>

García R., (2023). Evaluación de la expresión del gen Frizzled 7 durante el desarrollo y en la regeneración de la médula espinal de alevines de pez cebra (*Danio rerio*) mediante PCR. [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de México.

Goldshmit, Y., Sztal, T. E., Jusuf, P. R., Hall, T. E., Nguyen-Chi, M., & Currie, P. D. (2012). Fgf-dependent glial cell bridges facilitate spinal cord regeneration in zebrafish. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(22), 7477–7492. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0758-12.2012>

Gordon, M. D., & Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22429–22433. <https://doi.org/10.1074/JBC.R600015200>

Hachem, L. D., Ahuja, C. S., & Fehlings, M. G. (2017). Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation. <https://doi.org/10.1080/10790268.2017.1329076>, 40(6), 665–675.

Haisma, J. A., van der Woude, L. H., Stam, H. J., Bergen, M. P., Sluis, T. A., Post, M. W., & Bussmann, J. B. (2007). Complications following spinal cord injury: occurrence and risk factors in a longitudinal study during and after inpatient rehabilitation. *60 Journal of Rehabilitation Medicine*, 39(5), 393–398.

<https://doi.org/10.2340/16501977-0067>

Hardiman, O., Van Den Berg, L. H., & Kiernan, M. C. (2011). Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 7(11), 639–649. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2011.153>

He, X., Semenov, M., Tamai, K., & Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development (Cambridge, England)*, 131(8), 1663–1677. <https://doi.org/10.1242/DEV.01117>

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013a). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/NATURE12111>

Iqbal, J., Zaidi, M., & Avadhani, N. G. (2010). Cell signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1211, 3–8. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2010.05811.X>

Ishmael, F. T., & Stellato, C. (2008a). Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 101(4), 437–443. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60323-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60323-7)

Isogai, N., Asamoto, S., Nakamura, S., Sakurai, K., Ishihara, S., Ishikawa, M., Nishiyama, M., Yoshioka, F., Samura, K., & Kawashima, M. (2018). Spine and Spinal Cord Injury 61 Associated with a Fracture in Elderly Patients with Ankylosing Spondylitis. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 58(3), 103–109. <https://doi.org/10.2176/NMC.OA.2017-0112>

Jones, M. W., Apkarian, A. V., Stevens, R. T., & Hodge, C. J. (1987). The spinothalamic tract: An examination of the cells of origin of the dorsolateral and ventral spinothalamic pathways in cats. *Journal of Comparative Neurology*, 260(3), 349–361. <https://doi.org/10.1002/cne.902600303>

King, R. S., & Newmark, P. A. (2012). The cell biology of regeneration. *Journal of Cell Biology*, 196(5), 553–562. <https://doi.org/10.1083/JCB.201105099>

Knowlton, M. N., & Kelly, G. M. (2004). Zebrafish Mir antagonizes Frizzled 7-induced gastrulation defects. *Zebrafish*, 1(2), 133–144. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2004.1.133>

Kolb, S. J., & Kissel, J. T. (2015). Spinal Muscular Atrophy. *Neurologic Clinics*, 33(4), 831–846. <https://doi.org/10.1016/J.NCL.2015.07.004>

Kuhl, E. (2018). Mechanical Cues in Spinal Cord Injury. *Biophysical Journal*, 115(5), 751. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2018.04.052>

Kuypers, H. G. J. M. (1964). The Descending Pathways to the Spinal Cord, their Anatomy and Function. *Progress in Brain Research*, 11(C), 178–202. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)64048-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)64048-0)

Larasati, Y., Boudou, C., Koval, A., & Katanaev, V. L. (2022). Unlocking the Wnt pathway: Therapeutic potential of selective targeting FZD7 in cancer. *Drug Discovery Today*, 27(3), 777–792. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.12.008>

Lemke, M., Demediuk, P., McIntosh, T. K., Vink, R., & Faden, A. I. (1987). Alterations in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 147(3), 1170–1175. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(87\)80192-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(87)80192-4)

Li, Y., Liu, L., Barger, S. W., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2001). Vitamin E suppression of microglial activation is neuroprotective. *Journal of Neuroscience Research*, 66(2), 163–170. <https://doi.org/10.1002/JNR.1208>

Liu, D., Liu, J., Sun, D., Alcock, N. W., & Wen, J. (2003). Spinal cord injury increases iron levels: Catalytic production of hydroxyl radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(1), 64–71. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01184-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01184-X)

Liu, N. K., & Xu, X. M. (2012). Neuroprotection and its molecular mechanism following spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, 7(26), 2051–2062. <https://doi.org/10.3969/J.ISSN.1673-5374.2012.26.007>

Liu, W. M., Wu, J. Y., Li, F. C., & Chen, Q. X. (2011). Ion channel blockers and spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 89(6), 791–801. <https://doi.org/10.1002/JNR.22602>

Lunn, M. R., & Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet (London, England)*, 371(9630), 2120–2133. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60921-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60921-6)

MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2009.06.016>

Macleod, M. J., Taylor, J. E., Lunt, P. W., Mathew, C. G., & Robb, S. A. (1999). Prenatal onset spinal muscular atrophy. *European Journal of Paediatric Neurology : EJPN : Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 3(2), 65–72. <https://doi.org/10.1053/EJPN.1999.0184>

Maden, M. (1992). History Is Not Bunk: Book review for “A history of regeneration research. Milestones in the evolution of a science.” *Cell*, 69(5), 723–724. <http://www.cell.com/article/009286749290282H/fulltext>

Maden, M. (2018). The evolution of regeneration – where does that leave mammals? *The International Journal of Developmental Biology*, 62(6-7-8), 369–372. <https://doi.org/10.1387/IJDB.180031MM> 63

Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., Dellus, H., Hoppe, D., Stanek, P., Walter, C., Glinka, A., & Niehrs, C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature*, 417(6889), 664–667. <https://doi.org/10.1038/NATURE756>

Maden, M. (2018). The evolution of regeneration—where does that leave mammals?. *International Journal of Developmental Biology*, 62(6-7-8), 369-372.

Marques, I. J., Lupi, E., & Mercader, N. (2019). Model systems for regeneration: zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 146(18). <https://doi.org/10.1242/DEV.167692> Mecanismos bioquímicos desencadenados después de la lesión de médula espinal. (n.d.). Retrieved August 16, 2023, from <https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2020/28/Lara-Aparicio/HTML.html>

Mehta, A. S., & Singh, A. (2019). Insights into regeneration tool box: An animal model approach. *Developmental Biology*, 453(2), 111–129. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2019.04.006>

Moret, M. A., Zebende, G., Phillips, J. C., Quetzalcóatl Toledo-Marín, J., & Naimis, G. G. (2019). Beyond Phylogenetics: Darwinian Evolution of Actin. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.17488/RMIB.40.1.6>

Mortazavi, M. M., Verma, K., Harmon, O. A., Griessenauer, C. J., Adeeb, N., Theodore, N., & Tubbs, R. S. (2015). The microanatomy of spinal cord in-

jury: a review. *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 28(1), 27–36. <https://doi.org/10.1002/CA.22432>

Mukaino, M., Nakamura, M., Yamada, O., Okada, S., Morikawa, S., Renault-Mihara, F., Iwanami, A., Ikegami, T., Ohsugi, Y., Tsuji, O., Katoh, H., Matsuzaki, Y., Toyama, Y., Liu, M., & Okano, H. (2010). Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. *Experimental Neurology*, 224(2), 403–414. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2010.04.020> 64

Muneoka, K., Allan, C. H., Yang, X., Lee, J., & Han, M. (2008). Mammalian regeneration and regenerative medicine. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today :Reviews*, 84(4), 265–280. <https://doi.org/10.1002/BDRC.20137>

Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., & Bryant, S. V. (1986). Intrinsic control of regenerative loss in *Xenopus laevis* limbs. *Journal of Experimental Zoology*, 240(1), 47–54. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402400107>

Nashmi, R., & Fehlings, M. G. (2001). Mechanisms of axonal dysfunction after spinal cord injury: With an emphasis on the role of voltage-gated potassium channels. *Brain Research Reviews*, 38(1–2), 165–191. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00134-5)

Noorimotlagh, Z., Babaie, M., Safdarian, M., Ghadiri, T., & Rahimi-Movaghar, V. (2017). Mechanisms of spinal cord injury regeneration in zebrafish: a systematic review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(12), 1287–1296. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9620>

Nusse, R. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cell Research*, 18(5), 523–527. <https://doi.org/10.1038/CR.2008.47>

Orestes Cendreno. (1966). *Elementos de anatomía y fisiología humanas* (6a ed., Vol. 1). Librería de Porrúa Hnos.

Paintlia, M. K., Paintlia, A. S., Singh, A. K., & Singh, I. (2011). Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 116(4), 508–521. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.07136.X>

Papa, S., Mauri, E., Rossi, F., Perale, G., & Veglianese, P. (2020). Introduction to spinal cord injury as clinical pathology. *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102807-0.00001-6>

Passini, M. A., Bu, J., Roskelley, E. M., Richards, A. M., Sardi, S. P., O'Riordan, C. R., Klinger, K. W., Shihabuddin, L. S., & Cheng, S. H. (2010). CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular 65 atrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1253–1264. <https://doi.org/10.1172/JCI41615>

Perez Giraldo, G. S., & Ortiz Garcia, J. G. (2021). Immune-Mediated Disorders Affecting the Spinal Cord and the Spine. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 21(1). <https://doi.org/10.1007/S11910-020-01088-6>

Pilz, G., Wipfler, P., Ladurner, G., & Kraus, J. (2008). Modern multiple sclerosis treatment- what is approved, what is on the horizon. *Drug Discovery Today*, 13(23–24), 1013– 1025. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2008.08.003>

Plaza, V. B., Pacheco, B. M., Aguilar, C. M., Valenzuela, J. F., & Pérez, J. J. Z. (2012). Lesión de la médula espinal: actualización bibliográfica: fisiopatología y tratamiento inicial. *Coluna/Columna*, 11(1), 73–76. <https://doi.org/10.1590/S1808-18512012000100014>

Ponz, P., & Barber, A. M. (1993). *Neurofisiología* (13th ed., Vol. 1). Editorial Síntesis .

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/SUPPL_FILE/PORRELLO.SOM.PDF

Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z., Goutel, C., Fritz, A., Kelsh, R., Knapik, E., Liao, E., Paw, B., Ransom, D., Singer, A., Thomson, M., ... Talbot, W. S. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature Genetics* 199818:4, 18(4), 345–349. <https://doi.org/10.1038/ng0498-345>

Pourcho, R. G., Qin, P., & Goebel, D. J. (2001). Regenerating descending axons preferentially reroute to the gray matter in the presence of a general macrophage/microglial reaction caudal to a spinal transection in adult zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, 433(1), 131–147. <https://doi.org/10.1002/CNE.113166>

Rao, T. P., & Kühl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways:

a prelude for more. *Circulation Research*, 106(12), 1798–1806. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.219840>

Rowald, A., Komi, S., Demesmaeker, R., Baaklini, E., Hernandez-Charpak, S. D., Paoles, E., Montanaro, H., Cassara, A., Becce, F., Lloyd, B., Newton, T., Ravier, J., Kinany, N., D'Ercole, M., Paley, A., Hankov, N., Varescon, C., McCracken, L., Vat, M., Courtine, G. (2022). Activity-dependent spinal cord neuromodulation rapidly restores trunk and leg motor functions after complete paralysis. *Nature Medicine*, 28(2), 260– 271. <https://doi.org/10.1038/S41591-021-01663-5>

Sánchez, A. (2020). CELSR en los procesos de polaridad de seno. Universidad Nacional de Colombia .en una línea celular de cáncer

Sandler, A. N., & Tator, C. H. (1976). Effect of acute spinal cord compression injury on regional spinal cord blood flow in primates. *Journal of Neurosurgery*, 45(6), 660– 676. <https://doi.org/10.3171/JNS.1976.45.6.0660>

Semënov, M. V., Zhang, X., & He, X. (2008). DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21427–21432. <https://doi.org/10.1074/JBC.M800014200>

Sharma, H. (2005). Pathophysiology of blood-spinal cord barrier in traumatic injury and repair. *Current Pharmaceutical Design*, 11(11), 1353–1389. <https://doi.org/10.2174/1381612053507837>

Sheerin, F. (2004). Spinal cord injury: anatomy and physiology of the spinal cord. *Emergency Nurse : The Journal of the RCN Accident and Emergency Nursing Association*, 12(8), 30–36. <https://doi.org/10.7748/EN2004.12.12.8.30.C1178>

Shi, W. C., Fang, Z. B., Li, L., & Luo, L. F. (2015). Using zebrafish as the model organism to understand organ regeneration. *Science China Life Sciences*, 58(4), 343–351. <https://doi.org/10.1007/S11427-015-4838-Z/METRICS 67>

Siddiqui, A. M., Khazaei, M., & Fehlings, M. G. (2015). Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. *Progress in Brain Research*, 218, 15–54. <https://doi.org/10.1016/BS.PBR.2014.12.007>

Sinigaglia, C., Alié, A., & Tiozzo, S. (2022). The Hazards of Regeneration: From Morgan's Legacy to Evo-Devo. *Methods in Molecular Biology*, 2450,3–

25.https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2172-1_1

Speese, S. D., Ashley, J., Jokhi, V., Nunnari, J., Barria, R., Li, Y., Ataman, B., Koon, A., Chang, Y. T., Li, Q., Moore, M. J., & Budnik, V. (2012). Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell*, 149(4), 832–846. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.03.032>

Stockwell, B. R. (2022). Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications. *Cell*, 185(14), 2401–2421. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.06.003>

Sumanas, S., Kim, H. J., Hermanson, S. B., & Ekker, S. C. (2002). Lateral line, nervous system, and maternal expression of Frizzled 7a during zebrafish embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 115(1–2), 107–111. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00084-9)

Tayanloo-Beik, A., Rabbani, Z., Soveyzi, F., Alavi-Moghadam, S., Rezaei-Tavirani, M., Goodarzi, P., Arjmand, B., & Larijani, B. (2021). Cellular therapy for treatment of spinal cord injury in Zebrafish model. *Molecular Biology Reports*, 48(2), 1787–1800. <https://doi.org/10.1007/S11033-020-06126-7/METRICS>

Thau, L., Reddy, V., & Singh, P. (2022). Anatomy, Central Nervous System. *BMJ*, 1(4293), 478–478. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4293.47868>

Tisdale, S., & Pellizzoni, L. (2015). Disease Mechanisms and Therapeutic Approaches in Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Neuroscience*, 35(23), 8691–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0417-15.2015>

Uehara, S., Udagawa, N., & Kobayashi, Y. (2018). Non-canonical Wnt signals regulate cytoskeletal remodeling in osteoclasts. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 75(20), 3683–3692. <https://doi.org/10.1007/S00018-018-2881-1>

Ungar, A. R., & Calvey, C. R. (2002). Zebrafish frizzled7b is expressed in prechordal mesoderm, brain and paraxial mesoderm. *Mechanisms of Development*, 118(1–2), 165–169. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00221-6)

Velasco, J., & Riancho, J. A. (2008). La vía Wnt y el hueso. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 17(1), 5–9. [https://doi.org/10.1016/S1132-8460\(08\)71131-0](https://doi.org/10.1016/S1132-8460(08)71131-0)

Vilella, A. J., Severin, J., Ureta-Vidal, A., Heng, L., Durbin, R., & Birney, E.

(2009). EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Research*, 19(2), 327–335. <https://doi.org/10.1101/GR.073585.107>

Wang, M., de Marco, P., Capra, V., & Kibar, Z. (2019). Update on the Role of the Non-Canonical Wnt/Planar Cell Polarity Pathway in Neural Tube Defects. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 1198, 8(10), 1198. <https://doi.org/10.3390/CELLS8101198>

Wang, Y., Chang, H., Rattner, A., & Nathans, J. (2016). Frizzled Receptors in Development and Disease. *Current Topics in Developmental Biology*, 117, 113–139. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2015.11.028>

Wang, Y., Macke, J. P., Abella, B. S., Andreasson, K., Worley, P., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Nathans, J. (1996). A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene frizzled. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4468–4476. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.8.446869>

Wesley, C. S. (1999). Notch and Wingless Regulate Expression of Cuticle Patterning Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5743–5758. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.8.5743>

Whitfield, T. T., Mburu, P., Hardisty-Hughes, R. E., & Brown, S. D. M. (2005). Models of congenital deafness: Mouse and zebrafish. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2(2), 85–92. <https://doi.org/10.1016/J.DDMOD.2005.05.018>

Wilson, J. R., Forgione, N., & Fehlings, M. G. (2013). Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, 185(6), 485. <https://doi.org/10.1503/CMAJ.121206>

Xia, M., & Zhu, Y. (2015). The regulation of Sox2 and Sox9 stimulated by ATP in spinal cord astrocytes. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 55(1), 131–140. <https://doi.org/10.1007/S12031-014-0393-5>

Yu, H., Smallwood, P. M., Wang, Y., Vidaltamayo, R., Reed, R., & Nathans, J. (2010). Frizzled 1 and frizzled 2 genes function in palate, ventricular septum and neural tube closure: general implications for tissue fusion processes. *Development (Cambridge, England)*, 137(21), 3707–3717. <https://doi.org/10.1242/DEV.052001>

Zindler, E., & Zipp, F. (2010). Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology*, 24(4), 551–562. <https://doi.org/10.1016/J.BPA.2010.11.001>