



**Universidad Autónoma del estado de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales**



## **Descripción de la morfología de la mielina durante la regeneración de las fibras nerviosas de *Lumbriculus variegatus***

### **TESIS INDIVIDUAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

Presenta  
Diana Vanessa Rangel García

Dirigido por:  
Dr. Fausto Arellano Carbajal

Querétaro, Qro., Abril 2025

**La presente obra está bajo la licencia:**  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



## CC BY-NC-ND 4.0 DEED

### Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

#### **Usted es libre de:**

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

#### **Bajo los siguientes términos:**



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

#### **Avisos:**

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales



Descripción de la morfología de la mielina durante la regeneración de las fibras nerviosas de *Lumbriculus variegatus*

**Tesis individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**Presenta:**

Diana Vanessa Rangel García

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Sinodales

Dr. Fausto Arellano Carbajal  
Presidente

\_\_\_\_\_ Firma

Dr. Aldo Arturo Téllez García  
Secretario

\_\_\_\_\_ Firma

Dra. Olga Lidia Gómez Nucamendi  
Vocal

\_\_\_\_\_ Firma

Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños  
Vocal

\_\_\_\_\_ Firma

Dr. Francisco Josué López Martínez  
Vocal

\_\_\_\_\_

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Abril, 2025

## **DEDICATORIA**

A mis padres Juan y Laura que con todo su esfuerzo me han guía y apoyado.  
A mis hermanos Ana y Juan Pablo.

“Supongo que se podría decir lo mismo sobre casi todo en la vida. Nada es tan malo mientras mantengas el miedo alejado de tu cabeza”.  
-David Lynch y Mark Frost, Twin Peaks.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Fausto Arellano Carbajal por dirigir la presente tesis, por la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en el ámbito de la investigación, pero sobre todo por su gran paciencia y su comprensión. Le agradezco inmensamente el haber despertado mi admiración por la biología celular durante sus clases de Biología del Desarrollo, de las mejores que pude cursar.

Agradezco al Dr. Aldo Téllez García por instruirme con amabilidad y paciencia en este proyecto, por darme las bases de conocimiento teórico y guiarme en las técnicas utilizadas en la experimentación, por compartirme su interés y sus conocimientos en el manejo de *Lumbriculus* y por animarme siempre a lograr este proyecto.

A la Dra. Mónica Queijeiro, por apoyarme en la revisión del presente trabajo, por su disposición y sobre todo por su apoyo durante gran parte de mi trayecto por la licenciatura, por hacerme participe en el laboratorio de Ecología vegetal y darme oportunidad como becaria en sus proyectos, mismos que me sirvieron para guiarme durante la licenciatura.

Gracias a la Dra. Olga por su interés en este trabajo, por su disposición para brindarme las técnicas apropiadas para el mejoramiento de este proyecto. Al Dr. Josué López por la revisión en este proyecto, por su amabilidad, y disposición, a quien admiro por su gran trabajo con la comunidad estudiantil, por la energía y confianza que transmite durante el trayecto de la licenciatura. Agradezco al Dr. Israel Carrillo por interesarse en el aprendizaje de la comunidad estudiantil, por sus clases y la motivación para que seamos mejores. Gracias a Cecilia Barragán por el apoyo en el laboratorio durante esta tesis.

Agradezco al Dr. Alfredo Varela, por abrirme las puertas en el laboratorio de Desarrollo Neural y permitirme aprender sobre la regeneración celular. Al Dr. Carlos Lozano por transmitirme sus conocimientos en el tema de regeneración y por enseñarme a trabajar la biología molecular. A Jessica Trujillo y Rocío Cortes, por guiarme durante mi aprendizaje en este laboratorio.

Gracias a mis padres por todo el apoyo brindado no solo en este trabajo sino a lo largo de toda la licenciatura. A mi mamá Laura García por volverme una mujer trabajadora, valiente y perseverante. A mi papá Juan Rangel por educarme con conciencia y con respeto a la naturaleza, por enseñarme a valorarla y por inculcarme a tener un criterio. Agradezco a mis hermanos Ana y Juan Pablo por el amor incondicional. Agradezco a mi abuelo Gregorio por brindarme su apoyo, su sabiduría y cariño.

A mis amigas y compañeras desde el primer día Cristina Maya y Valeria Molina por todo su apoyo incondicional y el acompañamiento durante estos años, por permitirse crecer conmigo y por compartir más allá de las aulas.

A Denis Olvera, Monserrat Guzmán y César Ramírez, por ser buenos amigos y compañeros. A mi amiga Luh Hernández por compartir conmigo sus proyectos, por hacerme participe de sus aventuras y acercarme a la Etnobiología. A mi amigo Luis Pedraza por su acompañamiento en el servicio social y en parte de esta tesis. Agradezco a mi amiga Amairany Luna por continuar compartiendo conmigo a lo largo de todos estos años.

# ÍNDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE.....	6
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES.....	12
1. <i>Lumbriculus variegatus</i> .....	12
1.1 Biología .....	12
1.2 Morfología .....	13
1.3 Sistema Nervioso.....	14
1.4 Reproducción .....	15
2. Regeneración .....	16
2.1 Proceso de regeneración.....	16
2.2 Regeneración en anélidos .....	18
2.2.1 El sistema nervioso en la regeneración de anélidos .....	19
2.3 <i>Lumbriculus variegatus</i> como modelo en el proceso de regeneración .....	20
3. Mielina .....	21
3.1 Mielina.....	21
3.2 Mielina en invertebrados.....	22
3.4 Mielina en <i>L. variegatus</i> .....	24
HIPOTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	25
Objetivo General.....	25
Objetivos específicos .....	25
MATERIALES Y MÉTODO .....	26
Cultivo de <i>L. variegatus</i> .....	26
Tratamiento.....	26
Fijación .....	27

Laminillas.....	27
Tinción .....	29
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
Descripción de la morfología de la mielina durante la regeneración de la región anterior .....	32
Descripción de la morfología de la mielina durante la regeneración de la región posterior.....	53
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>74</b>
Una temporalidad definida en la regeneración de la mielina e implicaciones en el proceso de regeneración de <i>L. variegatus</i> .....	74
Implicaciones evolutivas para el entendimiento de sistemas nerviosos mielinizados.....	75
Implicaciones en la definición de mielina.....	76
<i>L. variegatus</i> como organismo modelo.....	76
Resultados de la metodología utilizada. ....	78
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>80</b>

## **RESUMEN**

Se ha descrito la presencia de mielina en el sistema nervioso de algunos invertebrados, tal es el caso de organismos pertenecientes al filo de los anélidos, en el cual se presentan especies con un alto interés en la investigación científica por presentar gran capacidad regenerativa. *Lumbriculus variegatus* es una de estas especies con alta capacidad regenerativa, pues puede regenerar completamente a partir de pequeños segmentos tanto la región anterior como la posterior, y al regenerar, su sistema nervioso también es capaz de regenerar la mielina que recubre los axones de fibras gigantes; por lo que esta especie podría ser propuesta como un modelo para entender la morfología en la regeneración de la mielina y su implicación evolutiva. Con lo anterior se elaboraron cortes histológicos con distinta temporalidad que permitieron identificar el momento en la regeneración en que se observó la presencia de mielina en el blastema por primera vez desde el inicio de la regeneración, encontrándose una diferencia en las ventanas de tiempo en la región anterior (144 hpa) y la región posterior (192 hpa). Este trabajo contribuye al estudio del proceso de regeneración de la mielina en el sistema nervioso de *L. variegatus*, por lo que esta especie es propuesta como un modelo que permita acercarnos al entendimiento de los procesos de remielinización en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple.

Palabras clave: anélido, mielina, sistema nervioso, regeneración, evolución.

## **ABSTRACT**

The presence of myelin has been described in the nervous system of some invertebrates, such as organisms belonging to the phylum Annelids, which are species of high interest in scientific research due to their great regenerative capacity. *Lumbriculus variegatus* is one of these species with great regenerative capacity, as it can completely regenerate both the anterior and posterior regions from small segments, and when regenerating, its nervous system is also capable of regenerating the myelin that covers the axons of giant fibers; therefore, this species could be proposed as a model to understand the morphology of myelin regeneration and its evolutionary implications. With the above, histological sections were prepared with different temporalities that allowed us to identify the moment in regeneration when the presence of myelin will be observed in the blastema for the first time since the beginning of regeneration, finding a difference in the time windows in the anterior region (144 hpa) and the posterior region (192 hpa). This work contributes to the study of the myelin regeneration process in the nervous system of *L. variegatus* and is therefore proposed as a model that allows us to approach the understanding of remyelination processes in neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis.

**Keywords:** annelid, myelin, nervous system, evolution.

## INTRODUCCIÓN

*Lumbriculus variegatus* es una especie de oligoqueto perteneciente a la familia Lumbriculidae que habita en pantanos de agua dulce y se reproduce predominantemente de forma asexual por fragmentación (Drewes y Brinkhurst, 1990). *L. variegatus* se ha presentado como un modelo para el estudio del proceso de regeneración en anélidos, por ser una especie con una gran capacidad regenerativa, ya que es capaz de regenerar ocho segmentos de la cabeza y un número variable de segmentos posteriores independientemente del sitio de fragmentación (Zoran, 2010).

La regeneración se define como el proceso de reparación y remplazo de regiones del cuerpo perdidas o dañadas, este proceso se presenta en distintos grupos de metazoos (Zoran, 2010) y en la actualidad se ha estudiado ampliamente en distintos organismos, lo que permite identificar las características en común o las diferencias que componen este proceso. Es importante tener en cuenta que el proceso de regeneración ocurre a varios niveles de organización biológica (Bely et al., 2014), que van desde la reparación de tejidos, hasta la formación de estructuras complejas.

Se han realizado estudios que describen la presencia de mielina en el sistema nervioso de algunos anélidos y sus posibles funciones. Dentro de estos estudios se han destacado aquellos de algunas especies como *Mastobranchus sp.*, *Prionospio steenstrupi*, *Clymene products*, *Clymenella torquata* y *Lumbricus terrestris*. De esta última especie se ha descrito la composición de las membranas que dan forma a la vaina de mielina (Roots y Lane, 1983). Sin embargo, no se ha descrito el proceso de regeneración de la mielina en ninguno de estos organismos.

A pesar de los grandes avances en el campo de las ciencias biomédicas, algunas enfermedades neurodegenerativas en los humanos siguen siendo un enigma, tal es el caso de la Esclerosis múltiple. Esta es una enfermedad que afecta directamente al sistema nervioso central, por efecto de una respuesta desencadenada por el sistema inmunitario que provoca la desmielinización y, por lo tanto, defectos en la

conducción del impulso nervioso (Domínguez et al., 2012; Pericot y Montalba, 2001). Aunque se han realizado varios estudios y tratamientos para atenderla, aun se presenta como la causa principal de discapacidad neurológica no causada por un trauma en adultos jóvenes (Domínguez et al., 2012). La desmielinización es uno de los factores abordados para tratar la esclerosis múltiple, y son pocos y limitados los ensayos clínicos que abordan la regeneración de la mielina (Koutsoudaki et al., 2020).

La investigación del proceso de regeneración de la mielina en *L. variegatus* y en otros organismos puede ayudarnos a entender el proceso de desarrollo y el origen que ha tenido la mielina mediante la comparación de características, con la finalidad de comprender las funciones y las ventajas que pudiera otorgar el recubrimiento de la mielina en múltiples organismos (Schweigreiter et al., 2006). Por otra parte, estudiar el proceso de regeneración de la mielina podría aportar estrategias para la reparación de la mielina y sus estructuras axonales, sirviendo como un modelo para la comprensión de procesos que desencadenan enfermedades en el sistema nervioso.

En este trabajo se elaboró una descripción de la morfología de la mielina en las fibras nerviosas de *L. variegatus*, identificando la ventana de tiempo en la que se forma durante el proceso de regeneración de sus extremos, realizando múltiples cortes al blastema y tinciones fluorescentes que permitieron detectar una señal producida por mielina.

## ANTECEDENTES

### 1. *Lumbriculus variegatus*

#### 1.1 Biología

El filo Annelida es un grupo de animales que apareció probablemente hace poco más de 600 millones de años (Fragoso y Rojas, 2014). Este grupo está constituido por una gran diversidad de gusanos que habitan en ambientes marinos, de agua dulce y terrestres. Se han descrito aproximadamente 17,000 especies miembros de este grupo (Bely et al., 2014; Zrzavý et al., 2009), las cuales comparten como característica principal un cuerpo alargado constituido por múltiples segmentos que pueden ir de unos pocos a más de cientos, son pocas las especies que alcanzan un número fijo de segmentos (Bely et al., 2014; Martínez et al., 2021). Son animales protostomados, presentan una amplia cavidad celómica rodeada por una pared compuesta de músculos circulares. La parte anterior la compone una cabeza constituida por un ganglio nervioso y un intestino con boca anterior; la parte posterior está compuesta por el ano; y a lo largo de todo el cuerpo se encuentra el sistema nervioso, ganglios ventrales y anillos nerviosos segmentarios (Bely et al., 2014).

Dentro de los anélidos se encuentra la clase Oligochaeta. Con distribución cosmopolita, los miembros de esta clase son la adaptación de los anélidos a los ambientes dulceacuícolas y terrestres. Se estima que se han propuesto aproximadamente 9,378 especies (Fragoso y Rojas, 2021). La principal característica es que presentan pocas y pequeñas quetas a lo largo de todo el cuerpo, aproximadamente 4 pares de estas por segmento (Fragoso y Rojas, 2021).

Los miembros del género *Lumbriculus* son distinguidos por presentar el extremo anterior con una pigmentación verdosa y un comportamiento de natación helicoidal (Gustafsson et al., 2009). Este comportamiento es habitual en miembros del género y es la manera en que se posan sobre las charcas, pues de los sedimentos sobresalen los extremos pigidiales en forma horizontal, creando una interfaz aire-

agua, que les permite a los organismos tener un intercambio gaseoso por medio del vaso sanguíneo dorsal (Drewes y Brinkhurst, 1990).

*Lumbriculus* ha sido estudiado desde el siglo XVIII (Martínez et al., 2021), lo que ha permitido obtener información sobre la biología de la especie *L. variegatus*. Esta especie ha sido identificada como un oligoqueto que habita principalmente en Europa, América del Norte (Pickavance, 2011; Sardo et al., 2007) y Asia (Sanches et al., 2023); puede habitar desde márgenes poco profundos de agua dulce, en charcas temporales, estanques y pantanos (Drewes y Brinkhurst, 1990; O'Gara et al. 2004); hasta grandes lagos y ríos, siendo menos abundante en estos últimos, se piensa que esto es debido al rápido movimiento y afluencia del agua, y al rápido lavado en las orillas de arenas y limo de las piedras, ya que prefieren hábitats de aguas estancadas que contienen poco movimiento, limo, barro y/o raíces (Pickavance, 2011). Se alimentan con materia orgánica y microorganismos que obtienen de los sedimentos del fondo (Brinkhurst y Gelder, 1991; O'Gara et al., 2004).

## 1.2 Morfología

La descripción morfológica de *L. variegatus* es general y correspondiente a las características propias del género; de cuerpo alargado, vermiforme y con múltiples segmentos que presentan pigmentación entre rojiza oscura y marrón (Martínez et al., 2021). En la pared corporal se observan lateralmente elaboradas ramificaciones que corresponden a los vasos sanguíneos (Marchese et al., 2015). La parte anterior que constituye la cabeza está formada por 8 segmentos que carecen de pigmento, esta región es conocida como prostomio. No presentan probóscide como en otros géneros, sino una boca ectodérmica. En la parte posterior, la región de la cola tiene un pigidio, una región no segmentaria en la que se presenta una zona de continuo crecimiento posterior (Martínez et al., 2021; Zattara, 2020).

### 1.3 Sistema Nervioso

En *L. variegatus* el sistema nervioso central está formado por un ganglio cerebral que se encuentra en el primer segmento de la región anterior, conectado a un cordón nervioso ventral que recorre cada uno de los segmentos del cuerpo (Drewes, 2002; Martínez et al., 2021). A excepción de los dos primeros segmentos de la región anterior, en cada segmento del cuerpo se presentan cuatro pares de nervios conocidos como nervios segmentarios, que van unidos al cordón nervioso ventral (Drewes, 2002).

El cordón nervioso ventral está formado por tres fibras gigantes. Las fibras gigantes se forman de la unión entre interneuronas dispuestas en cada segmento, lo que da lugar a los axones gigantes y son nombradas como: una fibra gigante media (axón medial) y dos fibras gigantes laterales (axones laterales) (Martínez et al., 2021). Se les distingue como fibras gigantes ya que son al menos una magnitud más gruesa que los demás axones que se observan con normalidad (Purschke, 2015), el diámetro en las fibras es variado respecto a la región del cuerpo, la edad del organismo o la etapa de regeneración (Drewes y Brinkhurst, 1990; Drewes y Fourtner, 1990; Martínez et al., 2021).

Los axones presentan una división celular de naturaleza septada con divisiones segmentarias por un tabique membranoso. Se ha observado que los axones presentan una envoltura de membranas de células gliales, que permiten la conducción sin interrupción de los impulsos nerviosos (Martínez et al., 2021). Esta envoltura glial cuenta con una apariencia y función similar a la que desarrolla la mielina en invertebrados (Drewes, 2002).

Las fibras gigantes juegan un papel crucial para las respuestas ante la depredación y/o el medio. De acuerdo con el estudio de O'Gara et al. (2004) en *L. variegatus* se ha observado que al estimularse de forma táctil el tercio anterior del cuerpo se obtiene respuesta de la fibra gigante media, mientras que al estimular de forma táctil

los tres cuartos posteriores del cuerpo la respuesta se obtiene de las fibras gigantes laterales.

#### 1.4 Reproducción

Aunque es poco estudiado, se tienen indicios sobre la reproducción sexual de *L. variegatus*. En el trabajo realizado por Drewes y Brinkhurst (1990) se ha descrito que la reproducción sexual es dada mediante la formación de capullos, los cuales tienen un tamaño aproximado de 3 a 5 mm de longitud y de 0.8 a 1.8 mm de ancho. Estos capullos contienen de 1 a 8 huevecillos en color amarillo-naranja con un diámetro aproximado de 300 a 600  $\mu\text{m}$ . El tiempo de eclosión de los huevecillos es de 2 a 4 semanas y los gusanos emergentes de estos huevecillos alcanzan el centímetro de longitud y carecen de pigmento.

Por otra parte, la reproducción asexual ha sido ampliamente abordada debido a que se observa con mayor frecuencia en los cultivos de laboratorios de investigación. En el laboratorio los organismos no alcanzan la madurez sexual y no son capaces de producir capullos, por lo que se reproducen por fragmentación asexual (Rosa et al., 2016). *L. variegatus* tiene la capacidad de formar un organismo nuevo a partir de un solo fragmento. Se piensa que este proceso está dado evolutivamente y ha permitido el escape de los organismos contra sus depredadores o sobrevivir al peligro dado por los cambios tan rápidos que enfrentan en el medio que habitan (Drewes y Brinkhurst, 1990).

Al proceso de reproducción asexual se le conoce como fisión, que si bien es un proceso que implica una relación muy estrecha con la regeneración debe tenerse en cuenta que, a diferencia de la regeneración, este proceso es iniciado por el propio gusano permitiéndole una preparación fisiológica y evolutiva distinta a la respuesta que el organismo presenta ante la fragmentación por una fuerza externa (Sardo et al., 2007; Zattara y Bely, 2016). En *L. variegatus* el proceso de fisión es iniciado con un reflejo de autotomía. En él, el organismo tiene un sitio específico en el que será

fragmentado conocido como “plano de ruptura”. En este sitio específico el organismo produce una contracción de los músculos circulares en conjunto de un anillo nervioso epidérmico (Martínez et al., 2021), lo que permite la fragmentación de los segmentos y un cerrado rápido que impide la pérdida del líquido contenido en el celoma y la conservación del resto de las estructuras.

## 2. Regeneración

### 2.1 Proceso de regeneración

La regeneración se define como “un proceso biológico de desarrollo que permite el remplazo de estructuras perdidas o dañadas” (Martínez et al., 2021). Este remplazo no solo debe dar lugar a la estructura sino también a la función de esta (Duran, 2008).

El proceso de regeneración se ha descrito en varios grupos de Metazoos. Sin embargo, es importante tener en cuenta, que la regeneración ocurre a varios niveles de organización biológica (Bely et al., 2014) que pueden ir desde la reparación de tejidos, la formación de estructuras complejas como son las extremidades o incluso la cabeza y la cola, hasta la formación de organismos completos que pueden surgir de un segmento o parte del animal. Este hecho tan asombroso está reportado en animales como las planarias, hidras y estrellas de mar (Chimal et al., 2011). Sin embargo, aunque la mayoría de los animales presenta la habilidad de curar heridas, no en todos tienen la capacidad de remplazar o completar una estructura (Bely y Nyberg, 2010).

La capacidad de regeneración en los organismos depende de sus relaciones filogenéticas y de factores importantes como la composición anatómica y fisiológica; es decir, que estos factores proporcionan variabilidad al proceso de regeneración y esta variabilidad no se da únicamente entre los organismos que no presentan una

relación genética sino también entre los órganos y tejidos de un mismo organismo (Quispe, 2019).

Esta variabilidad en la capacidad regenerativa ha sido de interés para el amplio estudio del proceso de regeneración en distintos taxones, permitiendo así la identificación de características en común o de las diferencias que componen este proceso. Tales diferencias se centran a un nivel celular, de acuerdo con Chimal et al. (2011) Ellos mencionan que la regeneración puede llevarse a cabo por medio de 4 mecanismos celulares, los cuales pudieran no ser aislados uno de otro e incluso pueden ser complementarios: la regeneración mediada por células troncales, la epimorfosis, morfalaxis y regeneración compensatoria.

Las células troncales son células indiferenciadas, con capacidad de autorrenovarse y especializarse (Anzaldúa et al., 2007), únicamente requieren recibir señales que les indiquen el inicio de una diferenciación celular para participar en la regeneración (Chimal et al., 2011; Pérez y Lorenti, 2006). En la epimorfosis, por medio de la proliferación celular se da la formación de un blastema que es un tejido compuesto por células indiferenciadas que dará lugar a la formación de una nueva estructura regenerada (Quispe, 2019). La formación de dicha estructura puede darse por la desdiferenciación de células de los tejidos lesionados, de células indiferenciadas, de células troncales o por la diferenciación de estas células (Chimal et al., 2011). La morfalaxis no requiere, o solo de forma muy reducida, de una proliferación celular, ya que se da por medio de una reorganización de los tejidos preexistentes (Chimal et al., 2011). Se define más como un reciclaje de los tejidos viejos que se transforman y sustituyen el tejido dañado o perdido (Quispe, 2019). En la regeneración compensatoria se da una proliferación de células diferenciadas que restablecen el tejido dañado (Chimal et al., 2011).

## 2.2 Regeneración en anélidos

La regeneración en anélidos es sumamente variada. Dentro de este grupo se encuentran linajes con grandes habilidades regenerativas, capaces de regenerar un cuerpo completo a partir de un único fragmento en cuestión de semanas, mientras que también se encuentran especies que no presentan la capacidad de regenerar (Bely et al., 2014; Martínez et al., 2021). Incluso algunas especies de anélidos se reproducen de forma asexual por medio de un proceso de fragmentación que se conoce como autotomía (Martínez et al., 2021).

A pesar de los esfuerzos por comprender la regeneración en anélidos Zattara y Bely (2016) reportan que, de 401 especies estudiadas, 11 son capaces de regenerar únicamente la región anterior, 25 solo regeneran la región posterior y 212 regeneran ambas regiones. Con estos datos y estudios previos (Bely et al., 2014), se sugiere que la capacidad de regeneración posterior es un rasgo ancestral para el filo.

Dentro de los linajes de anélidos con alta capacidad regenerativa, se ha estudiado el proceso de regeneración, evidenciándose que puede desarrollarse mediante el proceso de epimorfosis, por morfálaxis y en algunos organismos se puede dar una combinación de ambos procesos (Martínez et al., 2005). En los anélidos se ha estudiado principalmente el desarrollo de células pluripotenciales y multipotentes, ya que, tanto en los anélidos juveniles como en los adultos, la zona posterior presenta un crecimiento constante; por lo que se conoce que en algunas de las especies capaces de regenerar esta región es altamente proliferativa, produciendo los segmentos nuevos para el crecimiento normal y dando lugar a células progenitoras de nuevos tejidos durante la regeneración (Özpolat y Bely, 2016).

El género *Lumbriculus* (Clitellata: Lumbriculidae) ha sido ampliamente estudiado para el entendimiento del proceso de regeneración en anélidos debido a las múltiples especies con capacidad regenerativa que componen el género. Se presentan especies que regeneran todo su cuerpo a partir de un solo segmento y

esta capacidad no solo permite recuperar la estructura, sino también la función de dichos organismos (Martínez et al., 2021).

La investigación sobre el proceso de regeneración en el género *Lumbriculus* ha permitido entender y proponer las etapas que comprenden al proceso de regeneración. Martínez et al. (2021), dividieron el fenómeno de la regeneración en *Lumbriculus* en cinco etapas. La etapa 1 es la curación de la herida, en la que justo después de la amputación un grupo de músculos circulares que componen la pared corporal se contraen cerrando la cavidad celómica e impidiendo el contacto con el exterior. En la etapa 2, formación del blastema, se da la ingresión desde la epidermis de células en proliferación que formaran una masa de células des diferenciadas y sin pigmento. La etapa 3, diferenciación del blastema, las células que componen el blastema comienzan a diferenciarse formando un prostomio con forma de cono en la parte anterior y el pigidio en el ano para la parte posterior; en esta etapa se da la diferenciación de un ganglio cerebral, un estomodeo, una faringe, las neuritas que dan la conexión al ganglio cerebral con el cordón nervioso ventral y los anillos musculares circulares se forman de novo. La etapa 4, es la resegmentación y en ella las células del blastema se dividen en grupos para completar otras estructuras, los ganglios nerviosos se forman de un grupo ventral, se termina de formar el cerebro y músculos circulares adyacentes a la epidermis, lo que permite que se vayan formando nuevos segmentos a la parte posterior. Por último, la etapa 5, el crecimiento, en la que se ha concluido la diferenciación y la parte regenerada debe retomar el tamaño proporcional al demás cuerpo para su correcto funcionamiento (Martínez et al., 2021).

### 2.2.1 El sistema nervioso en la regeneración de anélidos

En experimentos enfocados al funcionamiento del cordón nervioso en la regeneración de algunas especies de oligoquetos se ha observado una alta capacidad regenerativa, estudiando principalmente la regeneración de las fibras

gigantes (Drewes et al., 1988; Lesiuk, y Drewes, 2001). En la regeneración de miembros del género *Lumbriculus* se ha visto que tal proceso requiere de un extremo de cordón nervioso ventral cortado, el cual se recupera y comienza a formarse a la par del blastema. También se han hecho extracciones del cordón nervioso ventral, lo que da como resultado la regeneración fuera de lugar que llega a formar la extremidad anterior o la posterior (Martínez et al., 2021).

### 2.3 *Lumbriculus variegatus* como modelo en el proceso de regeneración

La especie *L. variegatus* ha sido ampliamente estudiada y utilizada como modelo para el entendimiento del proceso de regeneración en anélidos. *L. variegatus* tiene la capacidad de regenerar en ambos sentidos: anterior y posterior a partir de un solo segmento corporal (Martínez et al., 2021). Tras sufrir una lesión forma un blastema en el que se observa una proliferación de células a 24 horas post amputación (hpa), el crecimiento y surgimiento de nuevos tejidos es visible a 120 hpa, hasta llegar a una temporalidad de 2 semanas en las que se concluye el proceso de regeneración (Téllez, 2022).

De acuerdo con Lesiuk y Drewes (2001), *L. variegatus* cuenta con características que lo vuelven ideal para el estudio de la plasticidad neural, estas son su alta capacidad de regeneración de segmentos, la formación de novo del cordón nervioso ventral y la capacidad para la transformación morfoláctica del sistema nervioso. Se han identificado cambios morfolácticos pasando 48 horas tras una lesión (Téllez, 2022) y respuestas de escape mediadas por la fibra gigante media de 6 a 24 horas tras un proceso de fragmentación (Lybrand et al., 2019).

### **3. Mielina**

#### 3.1 Mielina

La mielina es definida “como una vaina formada por múltiples capas de membranas que rodean los axones nerviosos” (Roots, 2008) y tiene la función de facilitar la propagación y aumentar la velocidad en los impulsos nerviosos (Roots, 2008; Werner, 2013). Estas capas están compuestas principalmente de lípidos y proteínas. La mielina ha sido estudiada y caracterizada ampliamente en los organismos vertebrados; sin embargo, se han reforzado las investigaciones en las que la presencia de mielina no es única de organismos vertebrados, sino también de organismos invertebrados, en los que se describe la existencia de capas que recubren los axones nerviosos. Aunque algunas de estas capas pueden variar en cuanto a su composición o estructura (Schweigreiter et al., 2006), se ha comparado su función (Günther, 1976; Kusano, 1966; Kusano y LaVail, 1971) y estas investigaciones sugieren que la definición y su descripción, no deben limitarse en términos únicamente a vertebrados (Hartline, 2008).

La función de la mielina está dada por una vaina axonal compuesta de múltiples láminas que aumentan la velocidad de conducción del impulso nervioso. El proceso de propagación del impulso es conocido como conducción saltatoria, inicia cuando el impulso ingresa por medio de canales de sodio en un nódulo, este es una región en el axón desprovista de mielina y a lo largo del axón se encuentran múltiples nódulos. Se forma una membrana internodal que permite la propagación del impulso con mayor velocidad ya que la vaina reduce la capacitancia (Hartline, 2008; Schweigreiter et al., 2006). Este proceso aumenta la velocidad de conducción en una magnitud mayor a comparación de una fibra no mielinizada que posea el mismo diámetro (Hartline, 2008; Roots, 2008).

### 3.2 Mielina en invertebrados

Se ha identificado la presencia de vainas axonales en organismos invertebrados de distinto grupo taxonómico: en miembros de Anélida y Artrópoda. En estos organismos se han observado vainas que presentan las propiedades funcionales y estructurales características de la mielina. De acuerdo con Hartline (2008) “las similitudes entre la mielina de diferentes taxones son mayores que las diferencias”, pero existe una amplia divergencia entre estos grupos mielinizados por lo que es poco probable que provengan de un ancestro en común. Con ello se propone que el surgimiento de la mielina en estos tres grupos ha sido de manera independiente como un ejemplo de evolución convergente (Roots, 2008).

A través de estudios de microscopía electrónica se ha observado que la mielina de distintos grupos de invertebrados tiene una estructura y función similar (Hartline y Colman, 2007). Es importante reconocer el papel evolutivo que confiere la presencia de mielina en el sistema nervioso de invertebrados, por lo que se plantea que la principal función es el proporcionar mayor velocidad de conducción del sistema nervioso (Hartline, 2008).

Hartline (2008) menciona que la hipótesis de las ventajas que otorga la presencia de mielina son el posibilitar en los organismos un mayor tamaño corporal, ya que facilita el mantener una comunicación entre las partes distantes. A su vez permite mejorar la sincronización de eventos, por lo que reduce el tiempo en la comunicación entre dos puntos y la reducción del requerimiento energético, permitiendo mejorar la capacidad de un organismo para resistir niveles bajos de oxígeno y períodos de inanición.

### 3.3 Comparación de la mielina de anélidos y vertebrados

El estudio de la estructura y composición de la mielina en distintos taxones ha permitido ampliar su definición y descripción, volviendo su funcionalidad uno de los

aspectos más importantes. Se han encontrado similitudes significativas en las características que presenta la mielina en distintos organismos tanto de invertebrados como vertebrados (Lybrand et al., 2019), al igual que diferencias que proponen que la mielina tiene un origen en la evolución convergente (Roots, 2008).

En el caso de los anélidos se cuenta con una referencia del estudio de la composición de la membrana mielinica. En *Lumbricus terrestris* se presenta una predominancia en proteínas de 42 y 80 kDa y en una porción menor proteínas de 28 a 32 kDa, que, en comparación a la composición proteica de la membrana en vertebrados, no presenta el contenido proteico importante como: la proteína básica de la membrana (MBP), la proteína proteolipídica (PLP) o la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (Roots, 2008). Estas proteínas son esenciales en la conformación de la mielina en vertebrados. La MBP es una proteína esencial en la mielinización del sistema nervioso central (Nawaz, 2013).

De forma estructural Hartline (2008) propone que “las similitudes entre las mielinas de diferentes taxones son mayores que las diferencias”, basándose en la comparación de cuatro rasgos: multiplicidad de la membrana, condensación de la membrana, sellos marginales y en los nodos.

En anélidos oligoquetos y en vertebrados se comparte la similitud de múltiples membranas no conductoras que rodean fuertemente los axones y que presentan un enrollamiento en forma de espiral (Hartline, 2008). La condensación de la membrana en oligoquetos se define como semicompacta, en los vertebrados las membranas son compactas en su totalidad. Esta es una forma de sellar vías de corriente extracelular que evitan el fallo con el aislamiento de la membrana (Roots, 2008). Otra forma de bloquear el fallo en la corriente es la estructura que confieren los bordes marginales. En oligoquetos estos bordes marginales están especializados y son similares a los desmosomas, confieren la estructura de filamentos gliales (Hartline, 2008). Mientras que en vertebrados se crean estructuras septadas que presentan la unión con los axones y permiten un sellado en la membrana (Roots, 2008). Las características y el tamaño de los nódulos son

importantes para el proceso de conducción del impulso nervioso. Los nódulos son interrupciones en la membrana mielínica. En los oligoquetos los nódulos se definen como “fenestrados” y han sido observados más a manera de poros circulares restringidos que atraviesan la membrana (Roots, 2008). En vertebrados la definición de los nódulos es bien conocida y se definen con forma anular y rodeando el axón (Hartline, 2008).

### 3.4 Mielina en *L. variegatus*

Estudios recientes reportan la presencia de mielina en anélidos, en específico para miembros del género *Lumbriculus* (Hartline, 2008), y la especie *L. variegatus* no es la excepción (Drewes y Brinkhurst 1990; Roots, 2008). Se plantea que tal característica ayuda al aumentar la velocidad de conducción en las fibras gigantes, facilitando un reflejo de escape rápido (Martínez et al., 2021).

## **HIPOTESIS**

*Lumbriculus variegatus* es capaz de llevar a cabo el proceso de regeneración de la mielina en una temporalidad definida durante el proceso de regeneración del sistema nervioso.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Analizar la morfología de la mielina en las fibras nerviosas gigantes en *Lumbriculus variegatus* durante y después de la regeneración, con el fin de establecer el tiempo en que regenera la mielina de las fibras nerviosas gigantes.

### **Objetivos específicos**

- 1) Elaborar una descripción de la morfología de la mielina en las fibras nerviosas de *Lumbriculus variegatus* durante la formación y desarrollo del blastema.
- 2) Establecer el margen de temporalidad en que se lleva a cabo el recubrimiento de mielina de las fibras nerviosas de *Lumbriculus variegatus* durante el proceso de regeneración en la región anterior utilizando ensayos de tinción de fluorescencia.
- 3) Establecer un margen de temporalidad en que se lleva a cabo el recubrimiento de mielina de las fibras nerviosas de *Lumbriculus variegatus* durante el proceso de regeneración en la región posterior utilizando ensayos de fluorescencia.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Cultivo de *L. variegatus*

Se usaron ejemplares de *L. variegatus*, adquiridos del proveedor comercial Aquarem, los cuales se mantuvieron en contenedores de plástico transparentes tipo pecera (proporciones de 30 cm x 20 cm x 20 cm). Las tapas de estos contenedores contaron con perforaciones que permitieron el flujo de oxígeno. A los contenedores se les agregó aproximadamente 400 ml de agua purificada, procurando que las lombrices quedaran superficialmente cubiertas, y también se añadieron tiras de toallas de papel biodegradable de 2.5 cm de ancho usadas como sustrato artificial (Lesiuk y Drewes, 2001). Los contenedores se colocaron en las condiciones específicas de 5° C y expuestos a poca luz. Para su mantención y estabilidad, se realizó un cambio de agua dos veces por semana y en cada cambio se agregó espirulina en polvo como alimento rociando sobre la superficie del agua (Téllez et al., 2021).

### Tratamiento

Para realizar el experimento se requirió de 96 organismos, los cuales se seleccionaron por medio de la observación en estereoscopio, tomando en cuenta características importantes como: no presentar anomalidades, que contaran con cabeza y cola, que no se hubieran seccionado recientemente (que no se visualizara un blastema o extremidad con poca o nula pigmentación), que el tamaño total del cuerpo fuera mayor a 2.5 cm, y que no presentaran cualquier otro carácter distintivo. Los organismos seleccionados fueron seccionados en la parte media utilizando una navaja de bisturí de forma ventral; separando la parte anterior (incluyendo la cabeza) y la parte posterior (incluyendo la cola) en cajas Petri. Se colocaron 12 organismos por caja teniendo un total de 16 cajas Petri: 8 cajas Petri con 12 organismos con región anterior y 8 cajas Petri con 12 organismos con región posterior. A las 16 cajas Petri se les agrego agua purificada y se colocaron en una

incubadora manteniéndola a 20°C mientras se llevaba a cabo el proceso de regeneración requerido para cada tratamiento.

### **Fijación**

Para visualizar el surgimiento de la mielina durante el proceso de regeneración se escogió una caja Petri con regiones anteriores y otra con regiones posteriores por cada 24h; es decir, cada 24h se fijaron 2 tratamientos: uno correspondiente a la parte anterior y el otro a la parte posterior por 8 días, teniendo por tanto fijación a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas post amputación (hpa).

Pasando las horas requeridas para la regeneración, según lo requiriera cada tratamiento respectivamente, en un tubo Eppendorf se colocaron los organismos correspondientes a un tratamiento (12 organismos), con ayuda de una pipeta se retiró la mayor cantidad de agua posible, y se agregó 400 µm de solución fijadora de paraformaldehído al 4 % (elaborada 1:1 con Paraformaldehído al 8 % y Buffer de paraformaldehído). La solución fijadora se dejó actuar durante una hora. Pasada la hora, se retiró del tubo la solución fijadora y se hicieron tres enjuagues utilizando tampón fosfato salino (PBS). Por último, se dejó la muestra en PBS y se almacenó a 5°C para ser utilizada posteriormente.

### **Laminillas**

Para la elaboración de laminillas se requirió la preparación de 4 cortes para cada organismo por tratamiento. Estos cortes se realizaron en la región de la regeneración: es decir, a los tratamientos separados con la región anterior se les hicieron 4 cortes en la parte que regeneró para recuperar la parte posterior y en los separados como región posterior se realizaron 4 cortes en el sitio de recuperación de la región anterior. Los cortes fueron hechos ventralmente, lo más finamente posible con ayuda de una navaja tipo exacto en punta de acero SK5, grosor de hoja de 0.05 mm.

El orden de estos 4 cortes por organismo corresponde a: la región más extrema del blastema (Regenerante 2); el siguiente a esta región es el blastema junto al sitio de amputación (Regenerante 1); el siguiente pertenece al cuerpo en donde se realizó la amputación (No Regenerante 1); y por último el continuo a esta región del cuerpo (No Regenerante 2), en la figura 1 se muestra el orden de los cortes correspondientes a la región anterior: Anterior Regenerante 2 (AR2); Anterior regenerante 1 (AR1); Anterior no Regenerante 1 (ANR1); y Anterior no Regenerante 2 (ANR2). La figura 2 corresponde a los cortes en la región de recuperación posterior: Posterior Regenerante 2 (PR2); Posterior regenerante 1 (PR1); Posterior no Regenerante 1 (PR1); y Posterior no Regenerante 2 (PNR2). Los cortes fueron almacenados en un tubo Eppendorf con 600uL de PBS y almacenados a 4°C para ser usados posteriormente.

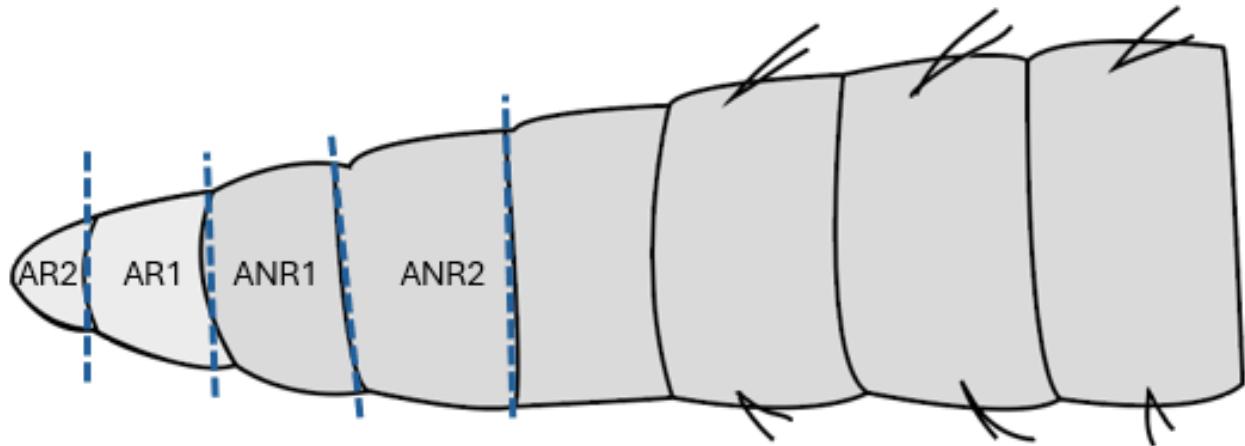


Figura 1. Representación esquemática de los cortes realizados en la región anterior, siendo la parte más clara el blastema: Anterior Regenerante 2 (AR2); Anterior regenerante 1(AR1); Anterior no Regenerante 1 (ANR1); y Anterior no Regenerante 2(ANR2).

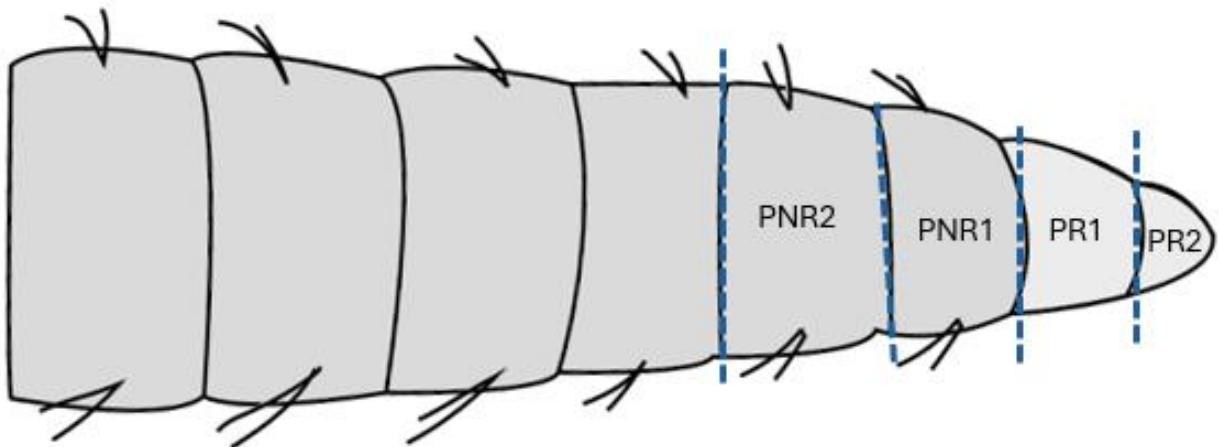


Figura 2. Representación esquemática de los cortes realizados en la región posterior, siendo la parte más clara el blastema: Posterior Regenerante 2 (PR2); Posterior regenerante 1(PR1); Posterior no Regenerante 1 (PNR1); y Posterior no Regenerante 2(PNR2).

### Tinción

Para elaborar la tinción, en una placa para cultivo celular se juntaron los cortes por región; es decir, en un pozo se colocaron los 12 cortes pertenecientes a AR1, en otro los 12 cortes correspondientes a AR2, en otro los correspondientes a ANR1 y uno más para los cortes ANR2. Se repitió el procedimiento para los cortes de la región posterior. Una vez colocados en el pozo, se retiró el PBS con el que fueron almacenados, para la tinción. En cada pozo se colocaron 400  $\mu$ L por pozo de tetraciclina preparada al 0.5%, la cual es capaz de teñir las membranas de mielina de vertebrados e invertebrados (Pereyra y Roots, 1988), la cual se dejó actuar por 2 minutos. Pasado este tiempo se realizaron dos enjuagues con agua destilada, posteriormente se agregaron 400  $\mu$ L de alumbre KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> preparado al 1%,

dejando reposar durante 6 minutos, y pasando este tiempo se realizaron 3 enjuagues con agua destilada. Se realizó una tinción de un corte en la región media y se tiñó bajo el mismo proceso para ser utilizado como control en relación con los resultados (Fig. 3).

Los cortes fueron montados sobre un portaobjetos y se agregó una gota de glicerol anhidro que recubrió los cortes para evitar que la muestra se seca. Los cortes fueron observados bajo microscopio de fluorescencia marca UNICO, modelo G506HS, filtro de excitación 475 y filtro de emisión 520. Se usó el aumento 20X. Las imágenes se obtuvieron utilizando la cámara de un móvil, usando el lente gran angular de 50MP, ISO 800 para rescatar la señal en las fotos de fluorescencia.

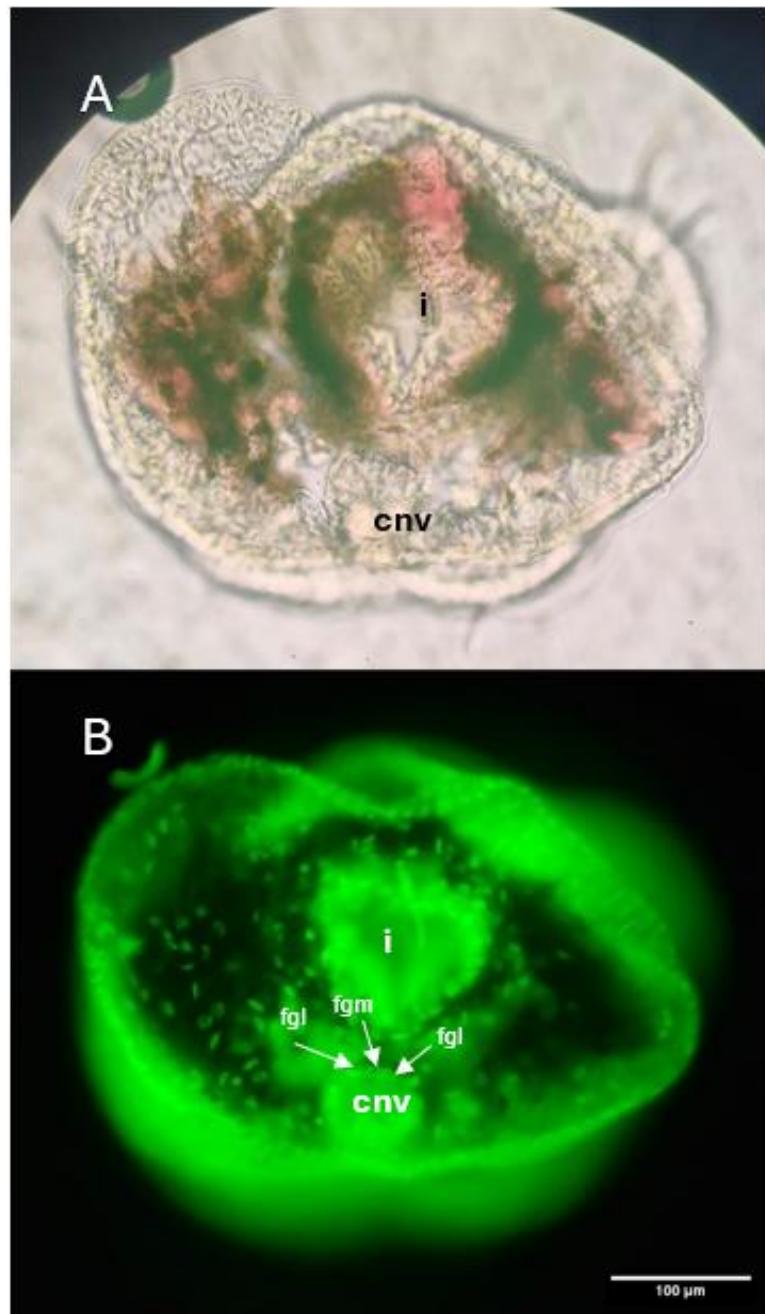


Figura 3. Corte ventral en una región media del cuerpo de *L. variegatus*. (A) Corte ventral observado bajo microscopio óptico, aumento 20x. (B) Corte ventral observado en microscopio de fluorescencia, aumento 20x, con señal de las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino.

## **RESULTADOS**

### **Descripción de la morfología de la mielina durante la regeneración de la región anterior**

Morfología anterior 24 hpa:

En esta temporalidad fue complicado distinguir entre el tejido que compone el blastema. La coloración fue poco distintiva, no se encontró presencia de las fibras gigantes y tampoco del cordón nervioso. En AR1, la región del blastema más cercana al cuerpo, únicamente se observó en el centro el tejido del intestino que aún no se desarrollaba en su totalidad pues presentaba una delimitación en forma circular y estaba rodeado por tejido color rojizo (Fig. 4B). En los cortes AR1 teñidos no fue posible distinguir la región en donde se formaría el cordón nervioso, únicamente se observó al intestino y las regiones que darían lugar a la vena dorsal y a la vena ventral (Fig. 4C).

La comparación de la estructuración que mantenían los cortes de ARN1, la región del cuerpo cercana al corte es muy distinta, permitió observar al intestino bien desarrollado, rodeado de músculo, la vena ventral y vena dorsal estuvieron bien delimitadas (Fig. 4D) y se identificó la estructura del cordón nervioso. Por medio de la tinción fue posible observar la señal de la mielina presente en las fibras gigantes (Fig. 4E).

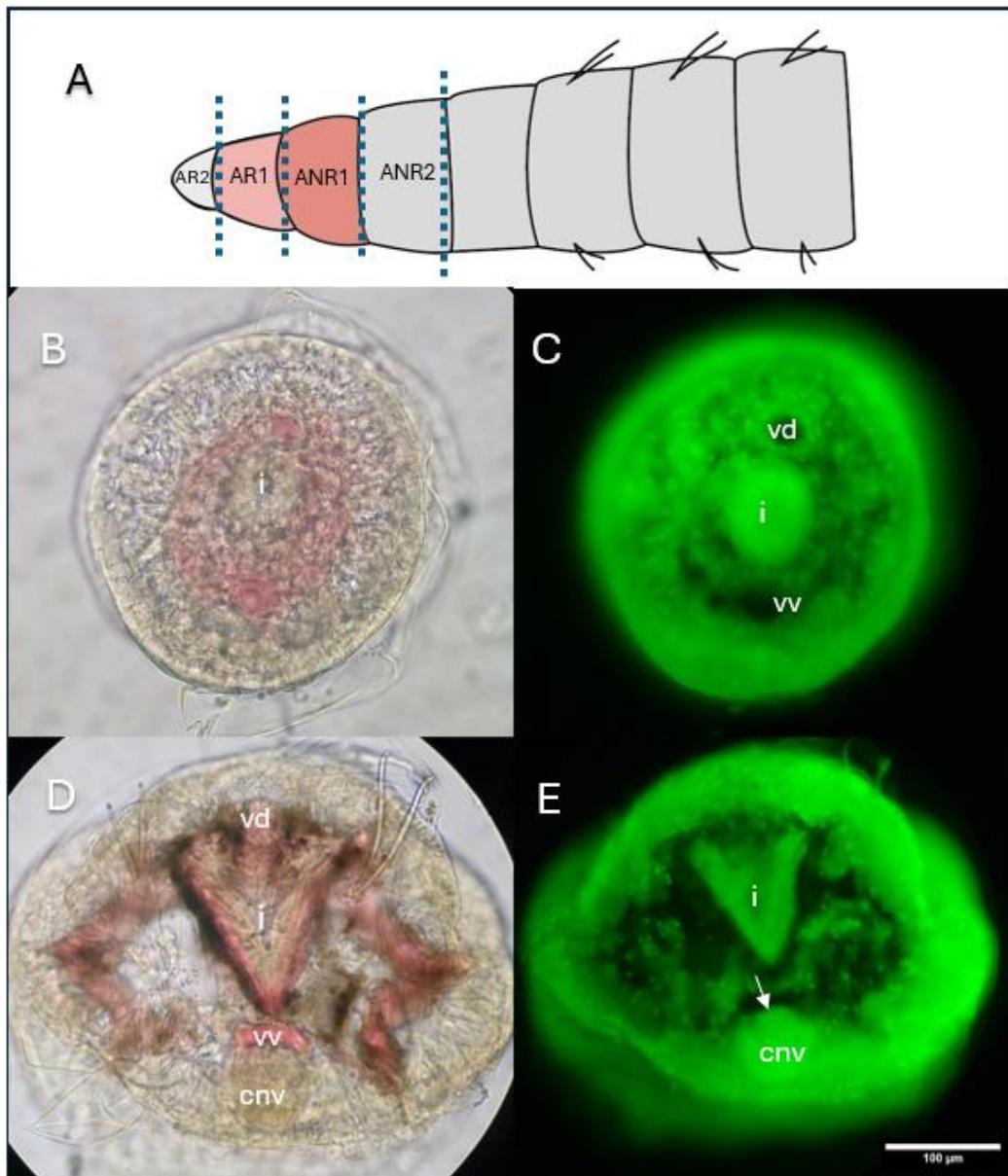


Figura 4. Cortes de región anterior de 24 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; AR1(B y C) y ANR1(D y E). (B) AR1 es la región del blastema cercana al cuerpo, se distingue poco el tejido. (C) AR1 región del blastema cercana al cuerpo bajo filtro de fluorescencia. (D) ARN1 región del cuerpo cercana al blastema. (E) ARN1 región del cuerpo cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, la flecha indica la señal que distingue la presencia de una fibra gigante; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

Morfología anterior 48 hpa:

La estructuración y distinción de los tejidos continúo siendo compleja, en AR1 se distinguió el tejido del intestino, la vena ventral y la vena dorsal (Fig. 5B). Si bien fue posible notar una formación del cordón nervioso, esta estructura fue poco definida y aun no se encontró una señal emitida por la mielina de las fibras nerviosas, por lo que las fibras gigantes no son evidentes (Fig. 5C).

El cambio estructural en el tejido de ANR1 fue parecido al observado a las 24hpa, se encuentran definidos el intestino, la vena dorsal y el cordón nervioso (Fig. 5D) Bajo tinción fue posible observar la señal para mielina en circunferencias amorfas, por lo que no pudo hacerse la distinción clara de cuál representa a la fibra gigante media o las fibras gigantes laterales (Fig. 5E).

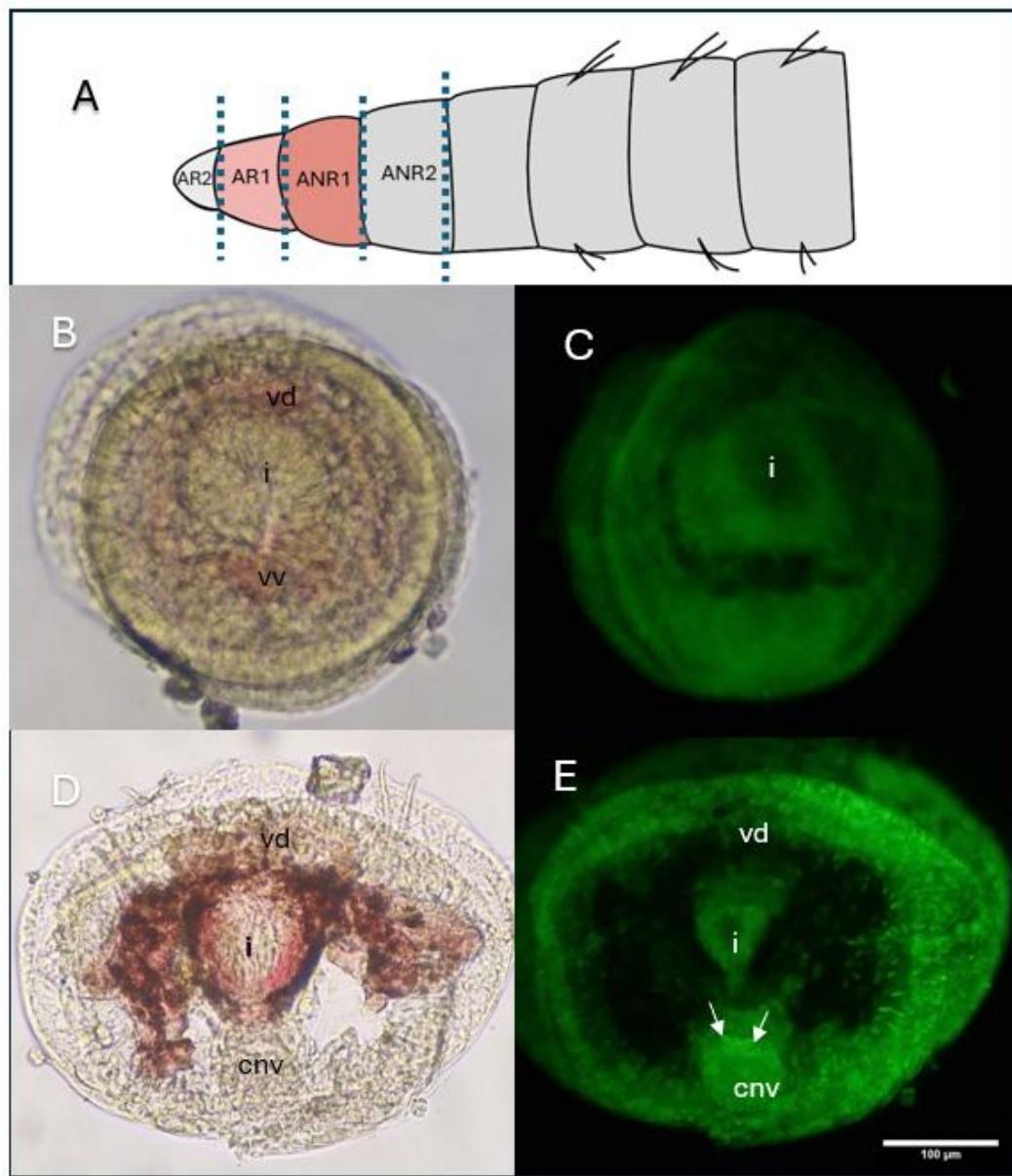


Figura 5. Cortes de región anterior de 48 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; AR1(B y C) y ANR1(D Y E). (B) AR1 es la región del blastema cercana al cuerpo. (C) AR1 región del blastema cercana al cuerpo bajo filtro de fluorescencia. (D) ARN1 región del cuerpo cercana al blastema. (E) ARN1 región del cuerpo cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican la señal de mielina en las fibras gigantes; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

### Morfología anterior 72 hpa:

La distinción y orientación del tejido fue más clara en AR1, se identificó el intestino rodeado de tejido que posiblemente dará lugar al músculo; las venas dorsal y ventral fueron evidentes y fue posible distinguir la región del cordón nervioso ventral (Fig. 6B). Bajo fluorescencia fue notoria una estructura definida en forma de “w”, esta era distintiva entre el resto del tejido y posiblemente parte de las células primordiales para la formación del cordón nervioso. Además, se observó el celoma y una definición mucho más sólida de la pared corporal (Fig. 6C).

La complejidad y estructuración de ANR1 fue más definida en comparación a las 24 y 48 hpa, pues además del intestino rodeado por el músculo y la vena dorsal y ventral, fue posible identificar las fibras gigantes laterales y la fibra gigante media dentro del cordón nervioso (Fig. 6D). Además, fue posible observar la señal emitida por la mielina en las fibras gigantes (Fig. 6E).

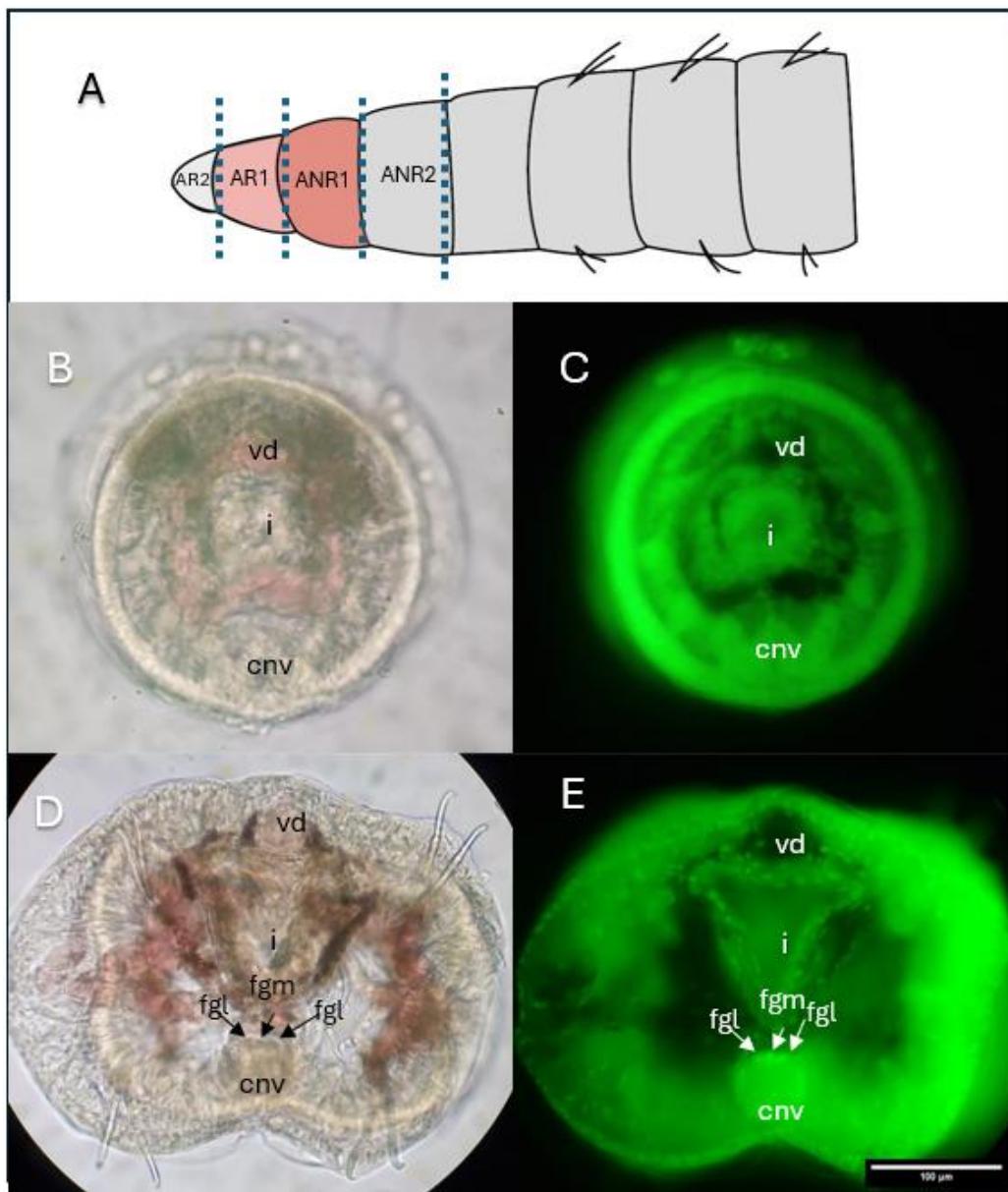


Figura 6. Cortes de región anterior de 72 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; AR1(B y C) y ANR1(D Y E). (B) AR1 es la región del blastema cercana al cuerpo. (C) AR1 región del blastema cercana al cuerpo bajo filtro de fluorescencia. (D) ARN1 región del cuerpo cercana al blastema, se observa la presencia de las fibras gigantes. (E) ARN1 región del cuerpo cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, con señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

### Morfología anterior 96 hpa:

En AR1 la estructuración de los tejidos pareció mantenerse, las venas ventral y dorsal se presentaron de forma ovalada-irregular, pero más definida en comparación con los tratamientos antes analizados; el cordón nervioso de forma ovalada continúo formando una “w” (Fig. 7B y C).

En ANR1 se observó una definición de los tejidos, compuesta por el intestino rodeado de músculo, la vena dorsal y vena ventral. En el cordón nervioso se distinguió notoriamente que las células forman una “w” que se va dispersando hacia el margen del cordón (Fig. 7D). También se presentaron las tres fibras gigantes, y el marcado para la presencia de mielina (Fig. 7E).

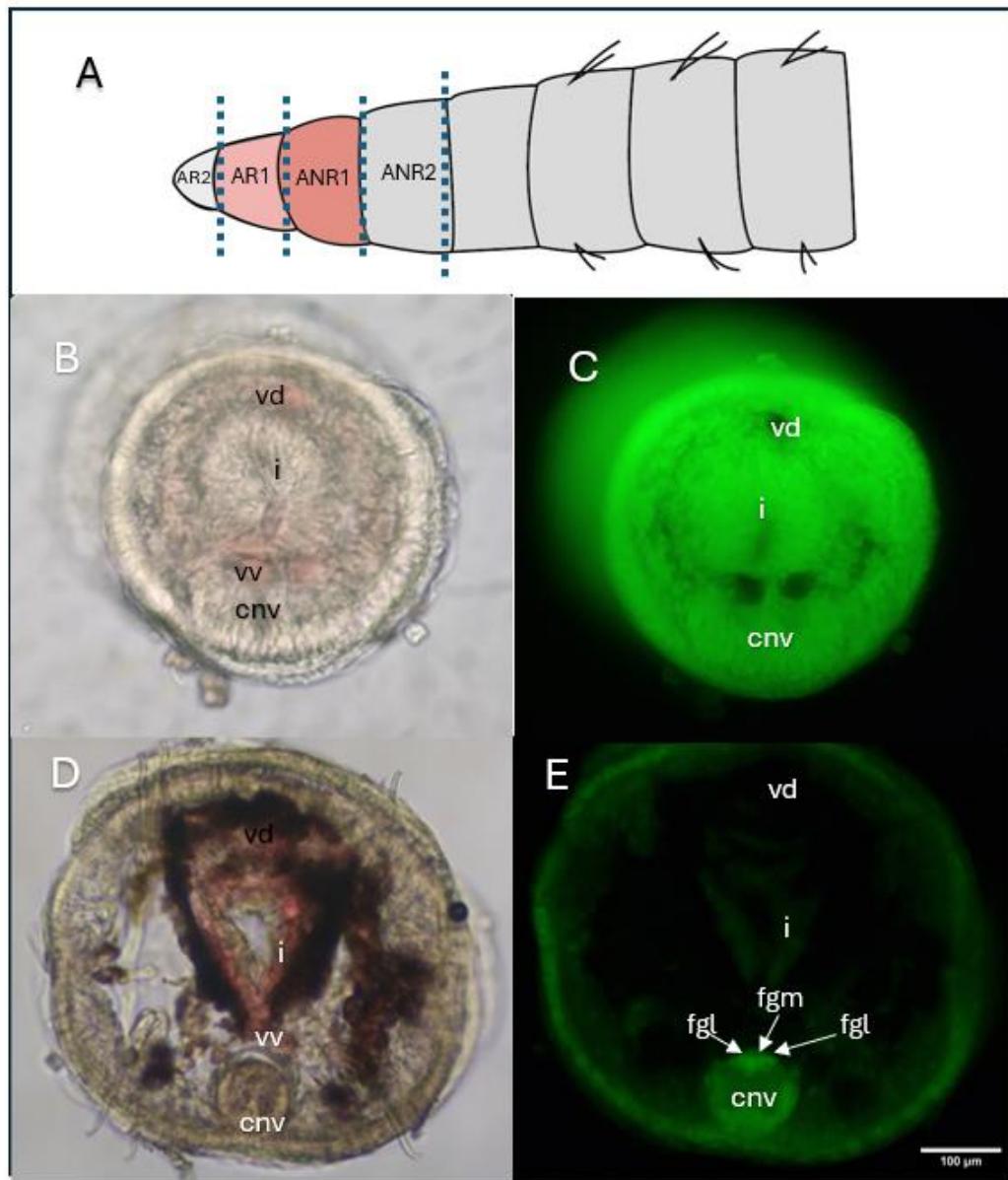


Figura 7. Cortes de región anterior de 96 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; AR1(B y C) y ANR1(D Y E). (B) AR1 es la región del blastema cercana al cuerpo. (C) AR1 región del blastema cercana al cuerpo bajo filtro de fluorescencia. (D) ARN1 región del cuerpo cercana al blastema. (E) ARN1 región del cuerpo cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia; con señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vasa dorsal; *vv*, vena ventral.

### Morfología anterior 120 hpa:

En AR2 no fue clara la orientación ventral-dorsal, ni la distinción de los tejidos, únicamente se reconoció el tejido que forma al intestino y la presencia de las venas sanguíneas (Fig. 8B). Pudo distinguirse el celoma que divide la región de la pared corporal y el intestino. Además, este delimitaba la zona en que se encontraban la vena dorsal y ventral, y no hubo presencia o indicio de la formación del cordón nervioso (Fig. 8C). El cambio en la estructuración de los tejidos fue notorio en los cortes AR1 en comparación a los tratamientos de temporalidad pasada. Fue evidente la orientación en la que se distinguió el intestino de forma circular, rodeado por tejido rojizo que continuó la circunferencia y en él estaban insertas las venas dorsal y ventral. Se observó el cordón nervioso bien definido (Fig. 8D), separado del resto del tejido por el celoma, y la formación en “w” continúo siendo muy distintiva, no fue posible observar señal para las fibras gigantes (Fig. 8E).

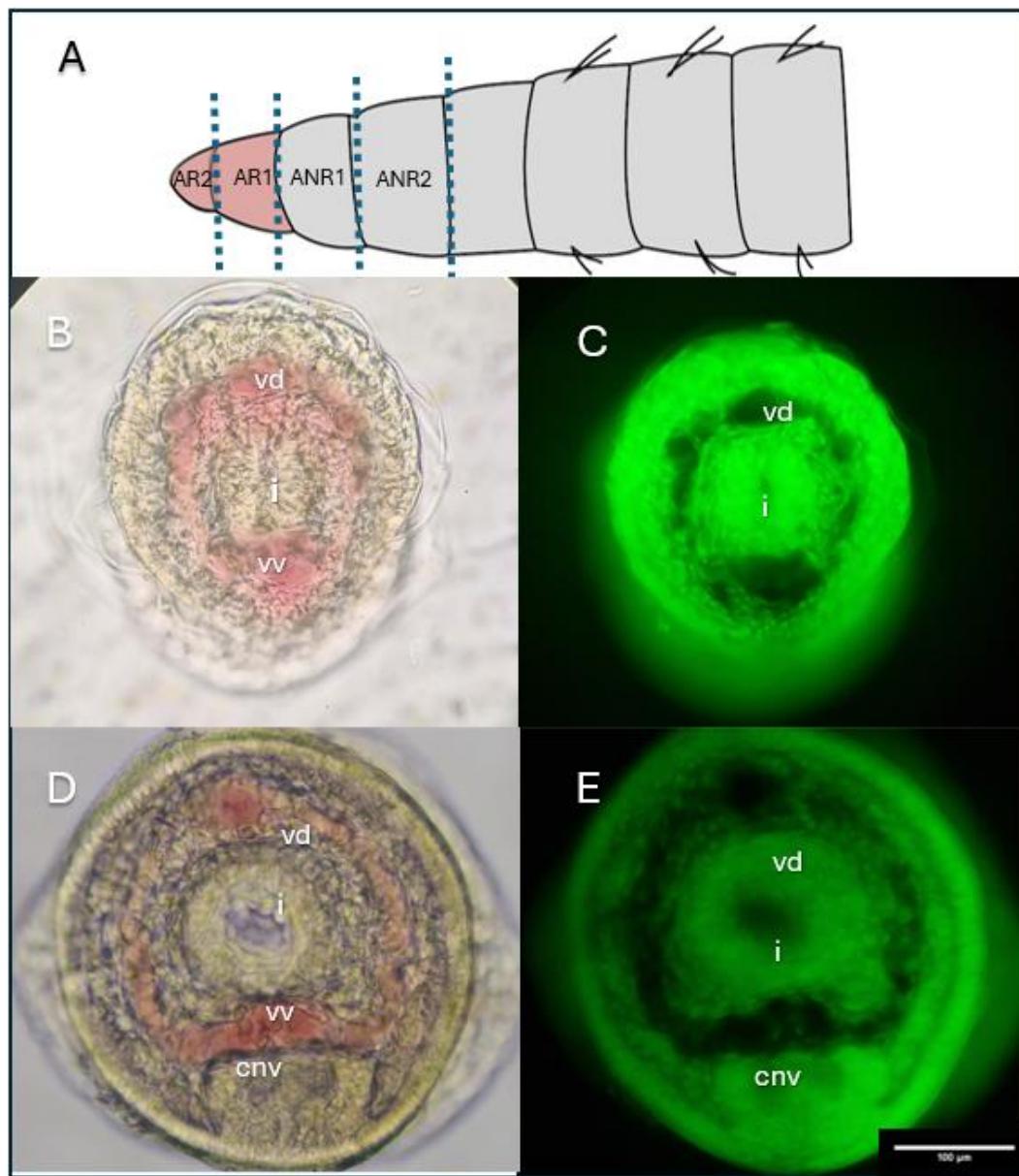


Figura 8. Cortes de región regenerante anterior de 120 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; AR2(B y C) y AR1(D y E). (B) AR2 es la región extrema del blastema; (C) AR2 la región extrema del blastema observada bajo filtro de fluorescencia; (D) AR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo; (E) AR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

Los cortes en ANR1 a las 120 hpa, mostraron mantener su estructura en la que se identificó el intestino, parte de los músculos, las venas ventral y dorsal, además de la región bien definida distintiva a las células que rodeaban el cuerpo (Fig. 9B). En el cordón nervioso fue posible observar las fibras gigantes, las cuales se presentaron marcadas en respuesta a la señal emitida por la tinción de la mielina (Fig. 9C). En los cortes de ANR2 esta estructuración se mantuvo, los tejidos fueron similares, a diferencia de una musculatura más definida (Fig. 9D). En el cordón nervioso fue posible observar las tres fibras gigantes, las cuales presentan la señal con relación a la tinción de la mielina (Fig. 9E).

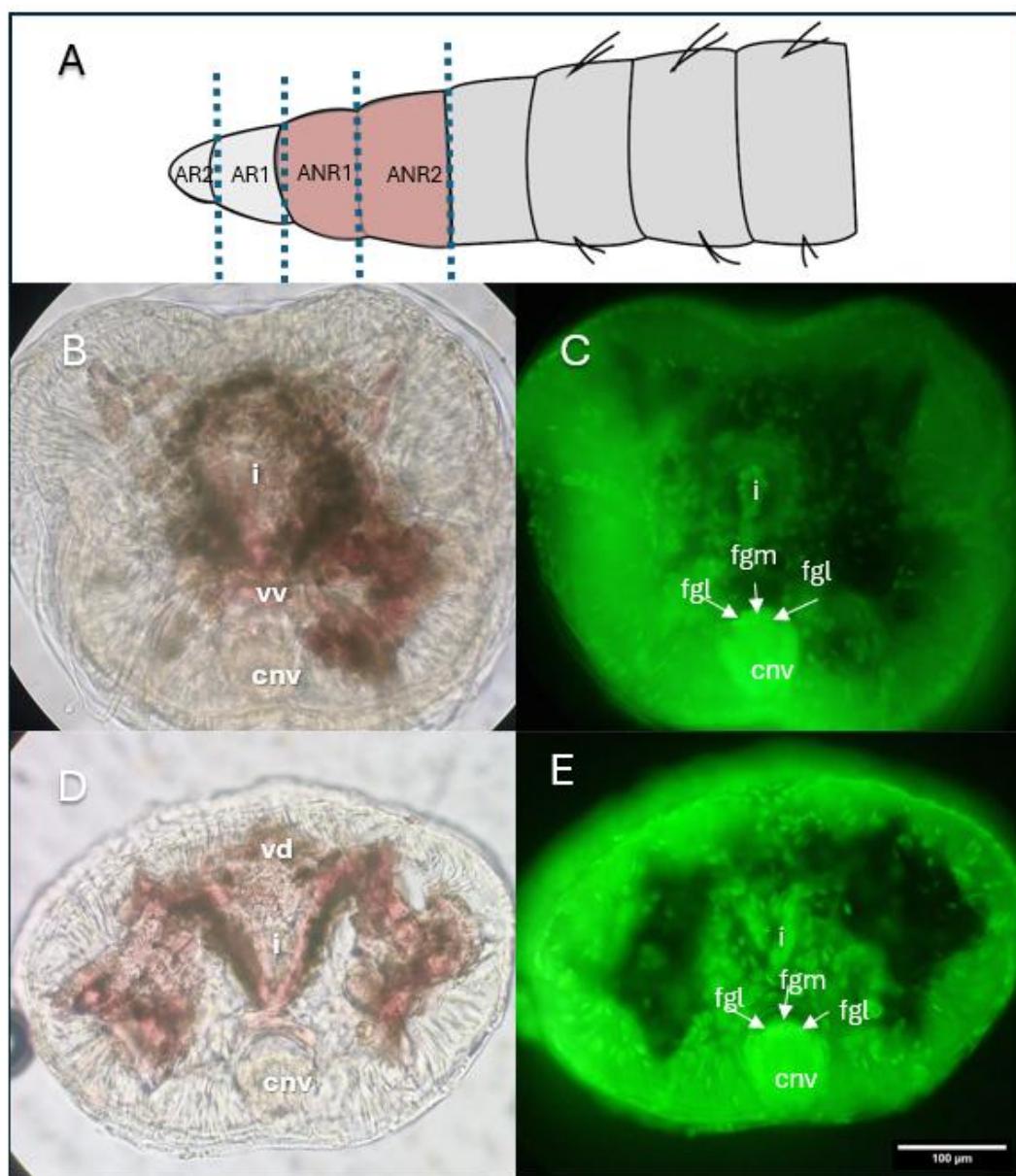


Figura 9. Cortes de región no regenerante anterior de 120 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; ANR1(B y C) y ANR2(D y E). (B) ARN1, es la región más cercana al blastema; (C) ARN1, más cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la presencia de señal de mielina en las fibras gigantes; (D) ARN2, más cercana al resto del cuerpo; (E) ARN2, más cercana al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la presencia de señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

### Morfología anterior 144 hpa:

Bajo esta temporalidad los cortes AR2, mostraron mayor definición en comparación a los tratamientos pasados. La organización del intestino y venas permitieron la orientación dorsoventral, además fue posible comenzar a notar los indicios de la formación del cordón nervioso en esta región (Fig. 10B). La tinción permitió observar una señal leve de las células comenzando a formar la “w” y se percibieron señales muy bajas que representan la tinción de la mielina durante el surgimiento de las fibras gigantes (Fig. 10C). Los cortes de AR1 mostraron una estructuración sólida conformada por el intestino, las venas, el cordón nervioso (Fig. 10D) y las células de la pared corporal diferenciadas del resto por un amplio celoma. Se registró la primera observación de la señal de mielina en la presencia de las fibras gigantes para esta región (Fig. 10E).

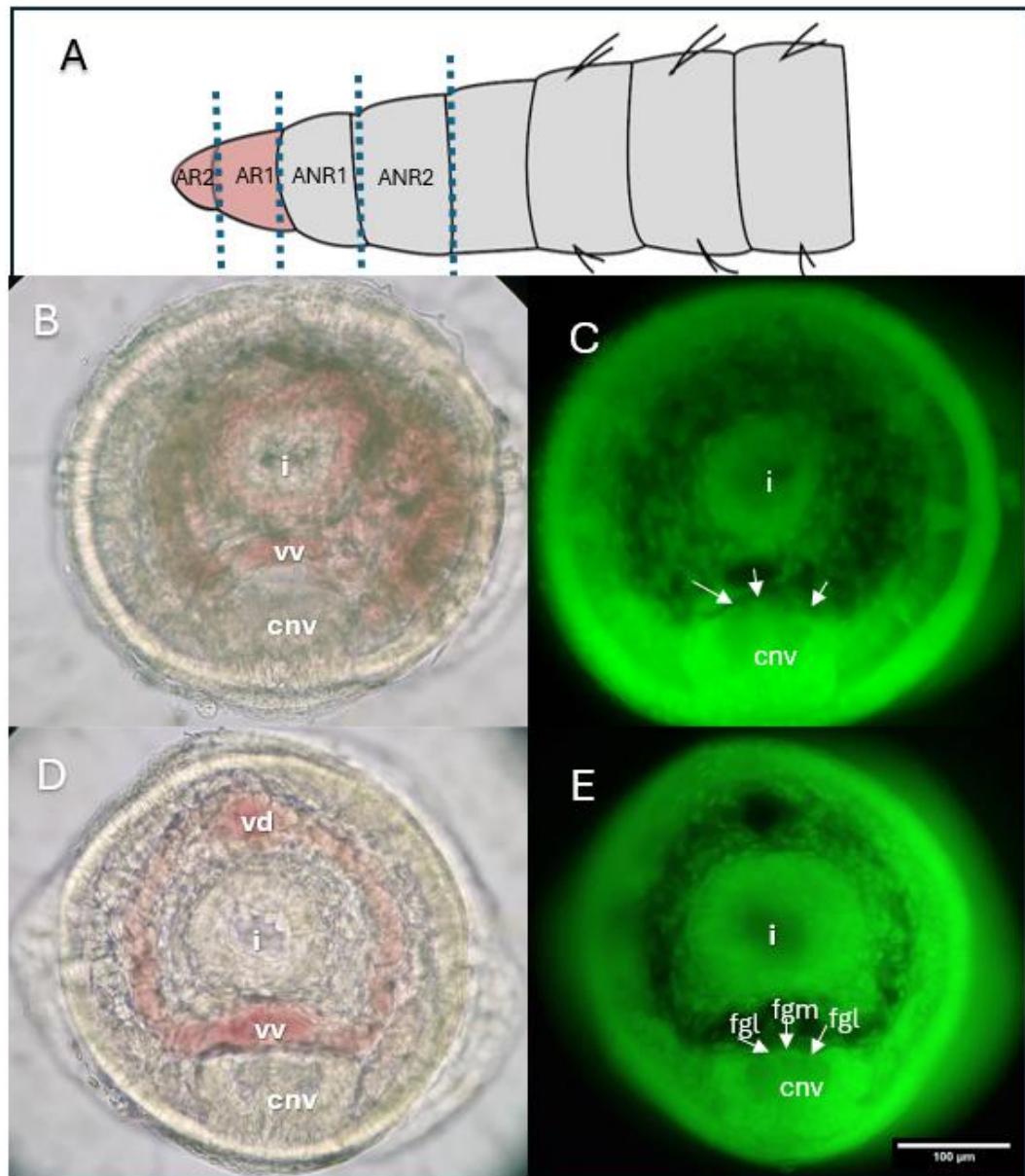


Figura 10. Cortes de región regenerante anterior de 144 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; AR2(B y C) y AR1(D y E). (B) AR2 es la región extrema del blastema; (C)AR2 la región extrema del blastema observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; (D) AR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo; (E) AR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

En los cortes ANR1 la estructura se mantuvo en comparación al corte realizado en una parte media del cuerpo (Fig. 2). El tejido muscular se definió y fue observado rodeando al intestino (fig. 11B). Se presentó un amplio celoma y fue evidente la señal en la mielina de las fibras gigantes (Fig. 11C). ANR2 fue constante con respecto a los observado en cortes de esta región en otras temporalidades pasadas, el tejido muscular fue más grande (Fig. 11D) y en el cordón nervioso se evidenció la señal de mielina en las fibras gigantes (Fig. 11E).

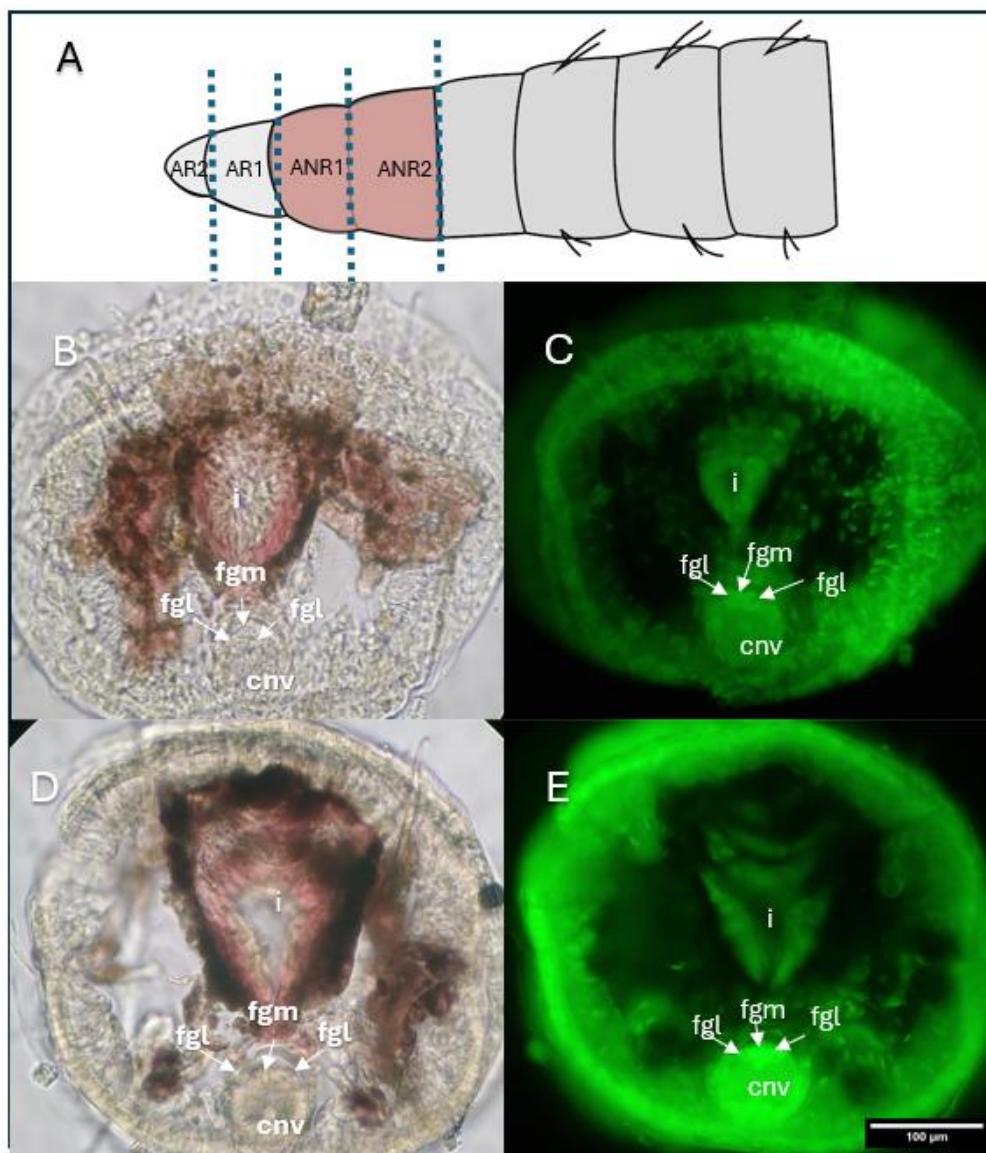


Figura 11. Cortes de región no regenerante anterior de 144 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; ANR1(B y C) y ANR2(D y E). (B)

ARN1, es la región más cercana al blastema, se observan las fibras gigantes; (C) ARN1, más cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; (D) ARN2, más cercana al resto del cuerpo, con presencia de las fibras gigantes; (E) ARN2, más cercana al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

#### Morfología anterior 168 hpa:

La AR2 mostró poco cambio en el desarrollo de los tejidos con respecto a los cortes analizados en la temporalidad pasada de la misma región. A diferencia de una delimitación más clara para las venas ventral y dorsal con una forma circular amorfa, se observó una reducción de espacio para la vena ventral entre el cordón nervioso y el intestino (Fig. 12B). El cordón nervioso presentó la formación de la “w” y la señal de mielina fue más intensa, por lo que se hacen visibles las fibras gigantes (Fig. 12C).

Los cortes de AR1, estructuralmente comenzaron a perder la forma redonda, tanto en la pared corporal como en el intestino. Los músculos comenzaron a desplegarse, las venas dorsal y ventral adquirieron forma más limitada y redonda (Fig. 12D), y fue posible distinguir la señal emitida por la mielina en los axones gigantes (Fig. 12E).

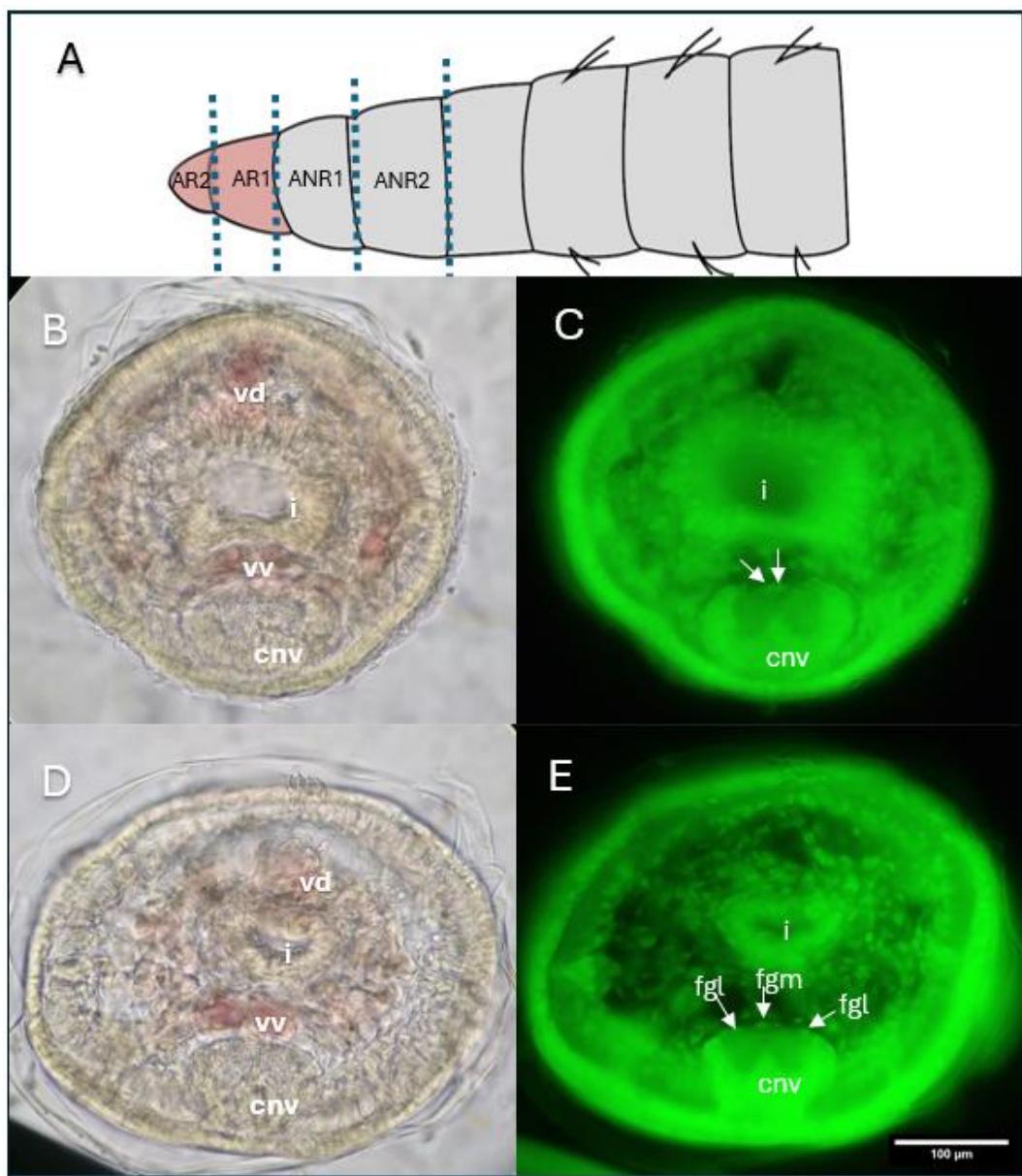


Figura 12. Cortes de región regenerante anterior de 168 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; AR2(B y C) y AR1(D y E). (B) AR2 es la región extrema del blastema; (C)AR2 la región extrema del blastema observada bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican la observación de la señal de mielina en las fibras gigantes; (D) AR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo; (E) AR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

Los cortes de ANR1 y ANR2 llegaron al punto de ser muy idénticos en cuanto a estructura y tamaño entre sí y en comparación a un corte ventral de la región media (Fig. 2). No hubo cambios distintivos entre los tejidos y en ambos se obtuvo la señal de mielina en las fibras gigantes (Fig. 13).

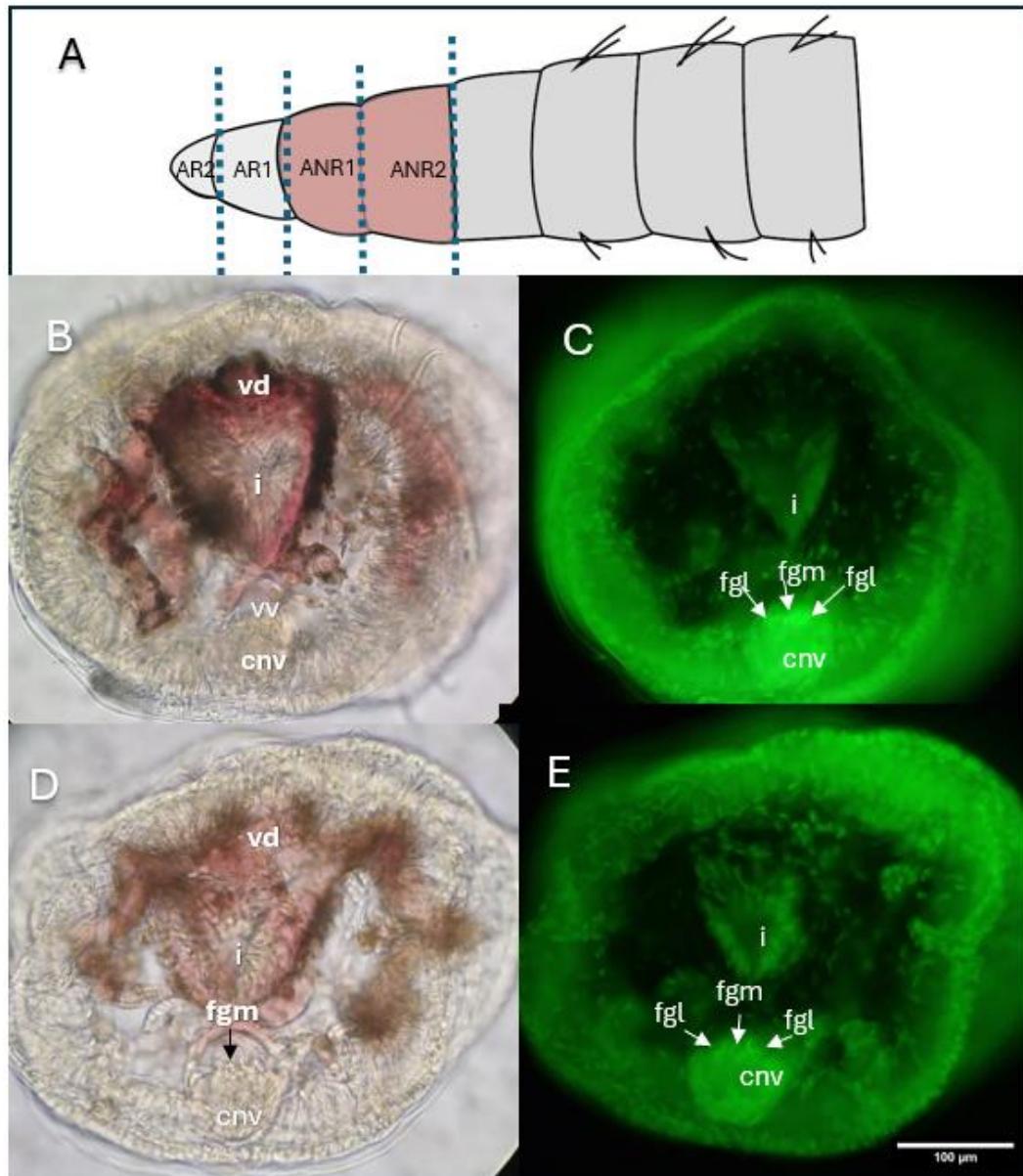


Figura 13. Cortes de región no regenerante anterior de 168 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; ANR1(B y C) y ANR2(D y E).

(B) ARN1, es la región más cercana al blastema; (C) ARN1, más cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; (D) ARN2, más cercana al resto del cuerpo; (E) ARN2, más cercana al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

#### Morfología anterior 192 hpa:

Los cortes AR2 comenzaron a cambiar en cuanto a la forma estructural dada desde la pared corporal, comenzándose a ensanchar, y perdieron la forma redonda que se había visto en los cortes AR2 de los tratamientos anteriores (Fig. 14B). El cordón nervioso continuó presentando la señal en forma de “w” evidente y se distinguió la señal para la mielina en las fibras gigantes (Fig. 14C). Los cortes de AR1 se mantuvieron en cuanto al desarrollo de sus tejidos, no hubo mayor cambio aparente y la mayoría del tejido muscular no presentó cambio (Fig.14D). Sin embargo, la señal de la mielina para las fibras gigantes presentó mayor intensidad (Fig. 14E).

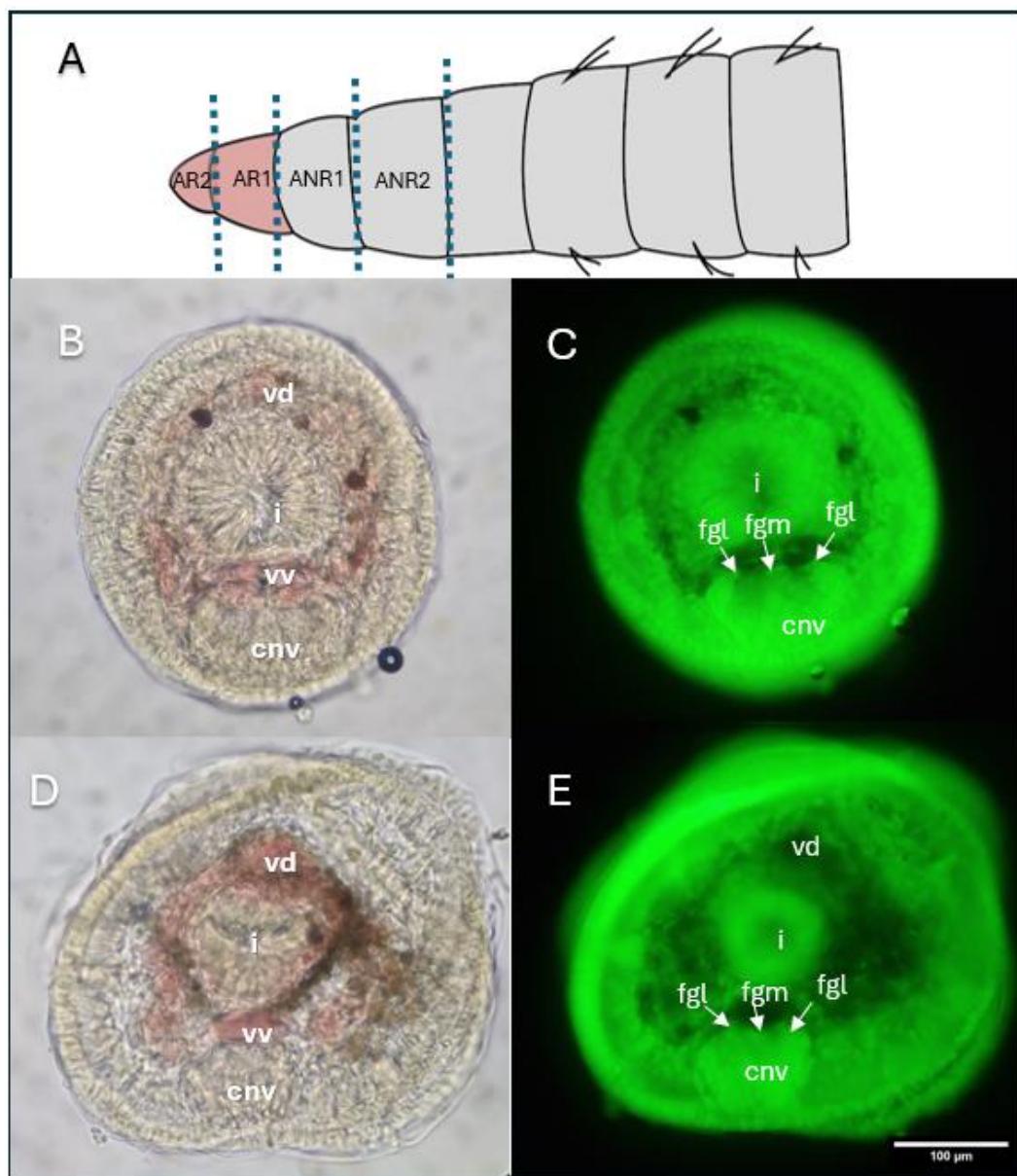


Figura 14. Cortes de región regenerante anterior de 192 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; AR2(B y C) y AR1(D y E). (B) AR2 es la región extrema del blastema; (C) AR2 la región extrema del blastema observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; (D) AR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo; (E) AR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

Bajo esta temporalidad los cortes pertenecientes a las regiones del cuerpo ANR1 y ANR2, no presentaron cambios aparentes en la organización o composición de sus tejidos. En el cordón nervioso de ambas regiones se observó la señal de mielina en las fibras gigantes (Fig. 15).

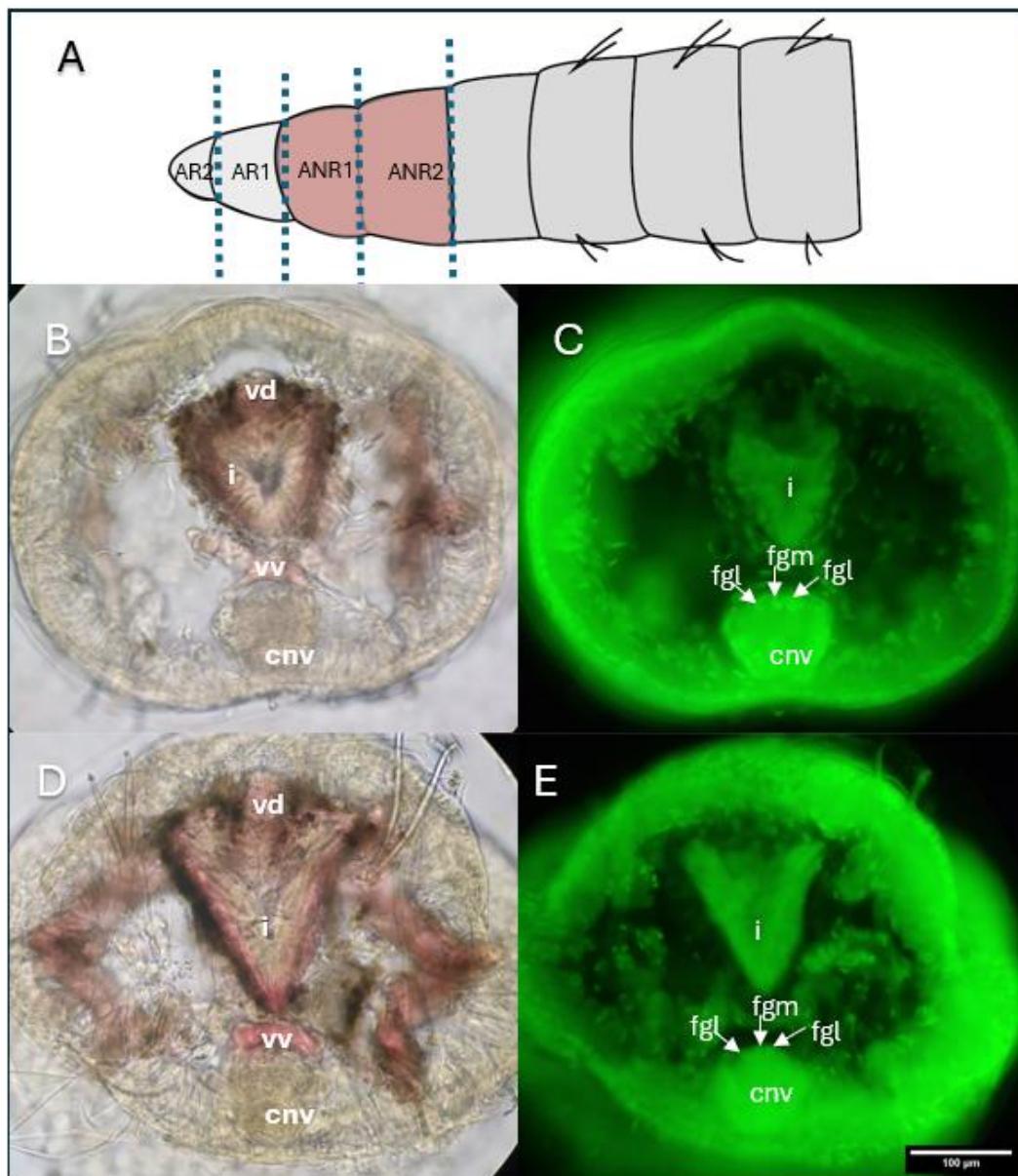


Figura 15. Cortes de región no regenerante anterior de 192 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; ANR1(B y C) y ANR2(D y E).

(B) ARN1, es la región más cercana al blastema; (C) ARN1, más cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de la mielina en las fibras gigantes; (D) ARN2, más cercana al resto del cuerpo; (E) ARN2, más cercana al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de la mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

### **Descripción de la morfología de la mielina durante la regeneración de la región posterior**

Morfología posterior 24 hpa:

Bajo esta temporalidad la organización de los tejidos fue muy temprana y no se logró encontrar una orientación en los cortes PR1, únicamente se observó el tejido que constituirá el intestino separado por el celoma del tejido que constituye la pared corporal (Fig. 16B y C).

En los cortes de PNR1 fue más sencillo orientar de forma ventral-dorsal, se observó el intestino delimitado y rodeado por tejido muscular (Fig. 16D), además de la presencia del cordón nervioso, pero no hubo señal de la mielina ni evidencia clara de las fibras gigantes (Fig. 16E).

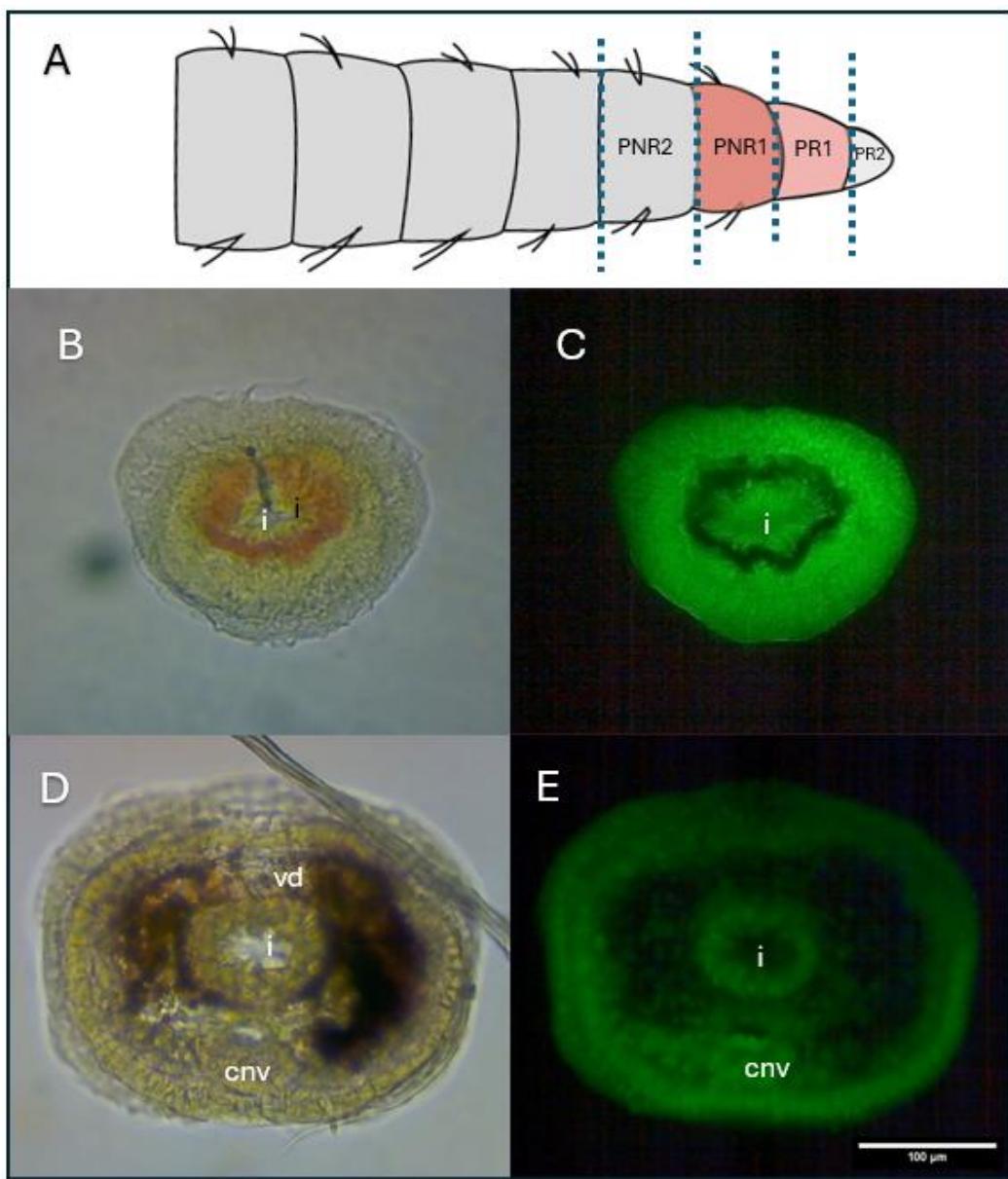


Figura 16. Cortes de región posterior de 24 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PR1(B y C) y PNR1(D y E). (B) PR1 es la región del blastema cercana al cuerpo, se distingue poco el tejido. (C) PR1 región del blastema cercana al cuerpo bajo filtro de fluorescencia. (D) PRN1 región del cuerpo cercana al blastema. (E) PRN1 región del cuerpo cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican la señal para las fibras gigantes; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

### Morfología posterior 48 hpa:

La estructura y definición de los cortes de PR1 fue compleja, porque no se observó gran distinción del tejido, solo fue distintivo el tejido que daría origen al músculo por su coloración rojiza; pero el resto parecía un mismo tejido en el que no se diferencian las venas ni el cordón nervioso (Fig. 17B y C).

En los cortes pertenecientes a la región del cuerpo PNR1 se observó una orientación dorsal-ventral completa, fue posible distinguir la presencia de la vena dorsal, el intestino rodeado de músculo, la vena ventral y el cordón nervioso, en el cual no se expresó la señal de mielina y tampoco fue posible reconocer la estructura o presencia de las fibras gigantes (Fig. 17D y E).

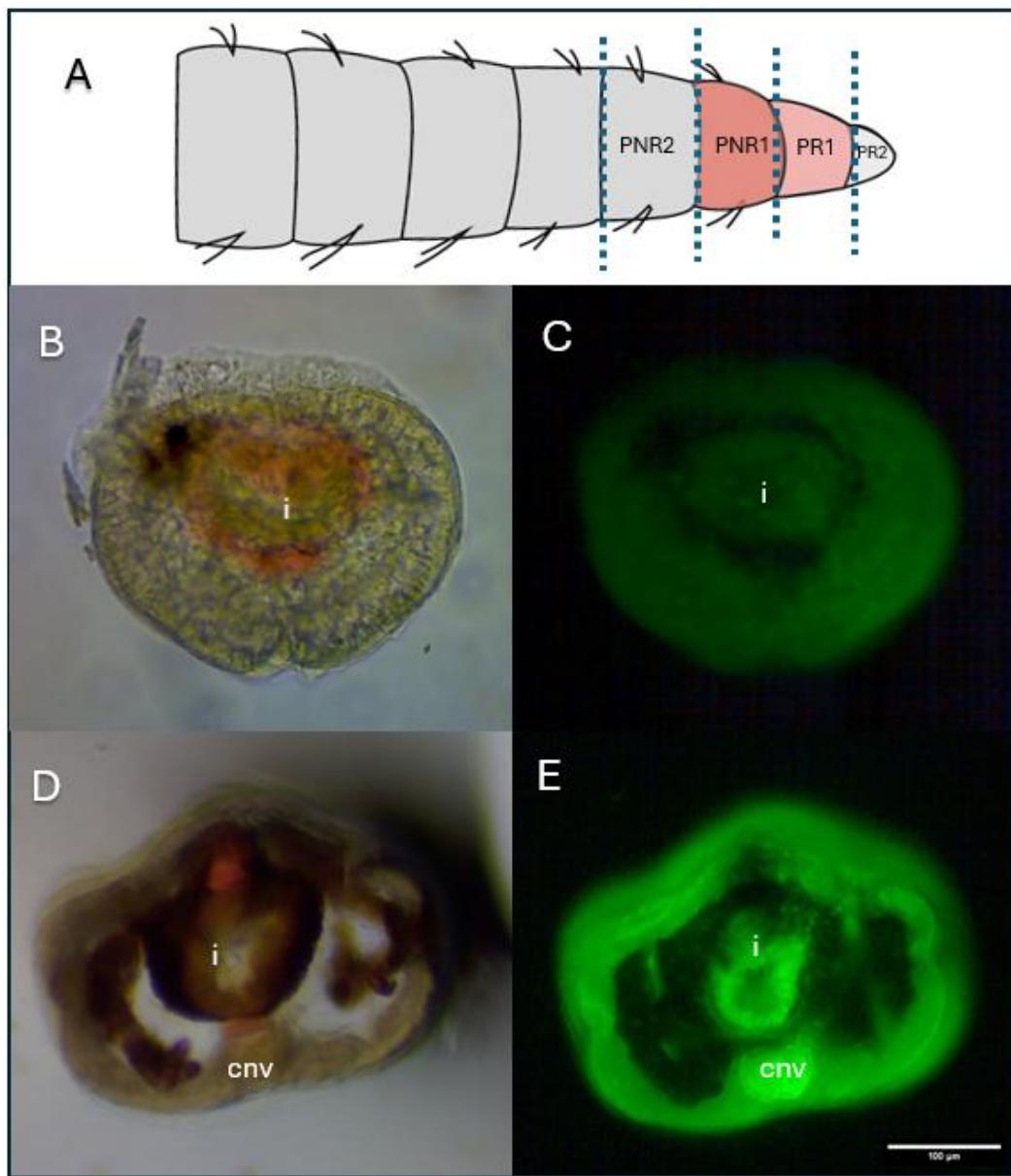


Figura 17. Cortes de región posterior de 48 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PR1(B y C) y PNR1(D y E). (B) PR1 es la región del blastema cercana al cuerpo. (C) PR1 región del blastema cercana al cuerpo bajo filtro de fluorescencia. (D) PRN1 región del cuerpo cercana al blastema. (E) PRN1 región del cuerpo cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican la señal en las fibras gigantes; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal.

### Morfología posterior 72 hpa:

Los cortes de la PR1 fueron difíciles de orientar de forma dorsal-ventral. Se observó que el intestino tuvo forma de media luna y no se situó en el centro como se vio en los cortes de 48 hpa (Fig. 18B) si no que este se situó más cercano a la pared corporal, mientras que en el extremo contrario se encontró cubierto de tejido (Fig. 18B). Mediante la fluorescencia se distinguió el celoma rodeando el intestino y no hubo presencia del cordón nervioso en esta región (Fig. 18C).

En la región PNR1 se identificó el intestino y las venas dorsal y ventral, además de una notoria diferenciación en el cordón nervioso (Fig. 18D). En el cordón nervioso fue evidente la presencia de posibles señales de tinción de mielina en las fibras gigantes, pero la intensidad de estas fue muy baja (Fig. 18E).

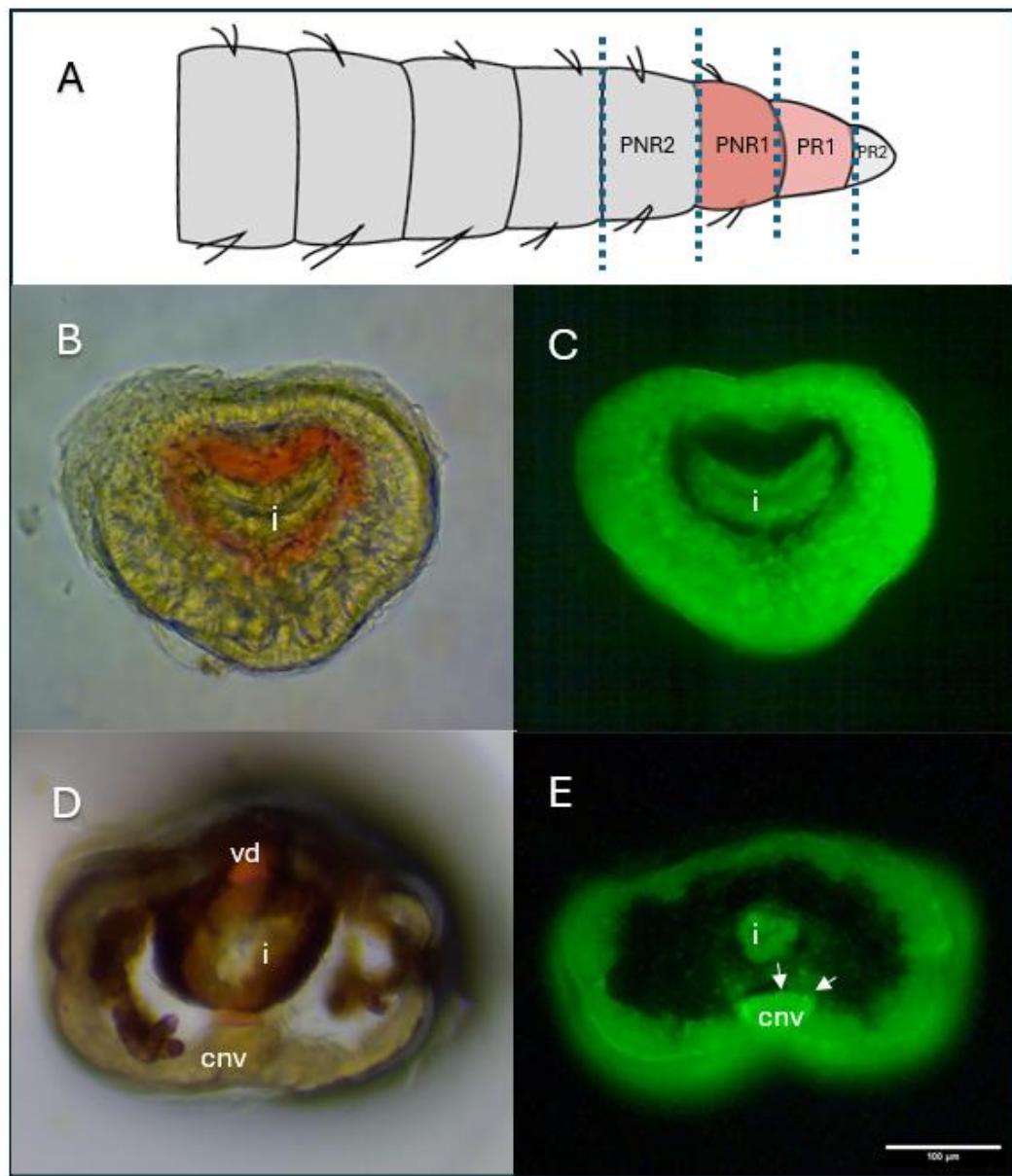


Figura 18. Cortes de región posterior de 72 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PR1(B y C) y PNR1(D y E). (B) PR1 es la región del blastema cercana al cuerpo. (C) PR1 región del blastema cercana al cuerpo bajo filtro de fluorescencia. (D) PRN1 región del cuerpo cercana al blastema. (E) PRN1 región del cuerpo cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican la señal en las fibras gigantes; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal.

### Morfología posterior 96 hpa:

En PR1 los cortes fueron difíciles de orientar; sin embargo, el intestino se identificó orientado hacia el centro y fue perdiendo la forma de media luna que se había observado con anterioridad (Fig. 19B). El tejido tanto en la pared corporal interior como en el intestino y las células y tejidos que compusieron esta estructura tuvieron una apariencia similar pues la coloración y la forma no permitieron distinguir alguna otra estructura (Fig. 19B). No se observaron indicios de la formación del cordón nervioso, solo una pared corporal que separa el intestino por el celoma (Fig. 19C).

Los tejidos en los cortes de PRN1 mostraron el intestino rodeado de músculo, la vena dorsal y ventral, y la presencia del cordón nervioso (Fig. 19D), el cual presentó poca señal que pudo indicar la presencia de mielina en las fibras gigantes (Fig. 19E).

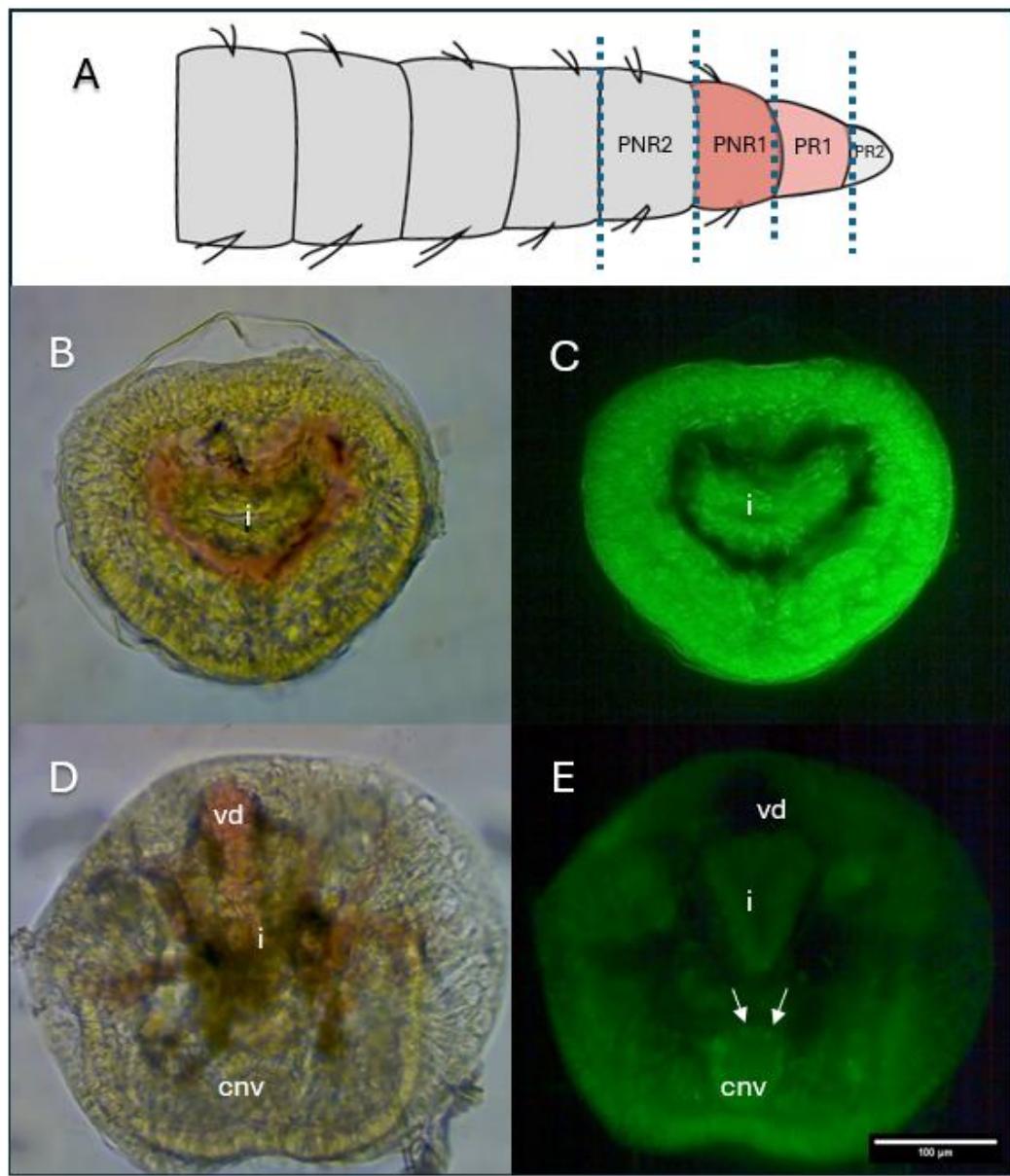


Figura 19. Cortes de región posterior de 96 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PR1(B y C) y PNR1(D y E). (B) PR1 es la región del blastema cercana al cuerpo. (C) PR1 región del blastema cercana al cuerpo bajo filtro de fluorescencia. (D) PNR1 región del cuerpo cercana al blastema. (E) PNR1 región del cuerpo cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican la señal en las fibras gigantes; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal.

### Morfología posterior 120 hpa:

En los cortes PR2 se posibilitó el comenzar a hacer una distinción entre la parte dorsal y la ventral. Se distinguió el tejido del intestino, que aun ligeramente mantuvo la forma de media luna. Se presentaron bien delimitadas las venas dorsal y ventral. La pared corporal fue gruesa (Fig. 20B) y en la región que se estableció como ventral de la pared corporal se extendió el tejido que pareció daría lugar al cordón nervioso. No se obtuvo evidencia de la señal para la mielina en las fibras gigantes (Fig. 20C). En PR1, los cortes también presentaron una orientación, el intestino se encontró más expandido en comparación a los cortes vistos en PR2 y se observó parte del tejido que daría lugar a los músculos y las venas dorsal y ventral (Fig. 20D). Fue posible identificar el indicio de la formación del cordón nervioso, el cual surgía de un abultamiento que se formó en la región ventral, y se percibió la señal que daba forma a una “w”. No fue posible identificar la presencia de las fibras gigantes, por lo que la tinción no mostró señal para la mielina (Fig. 20E).

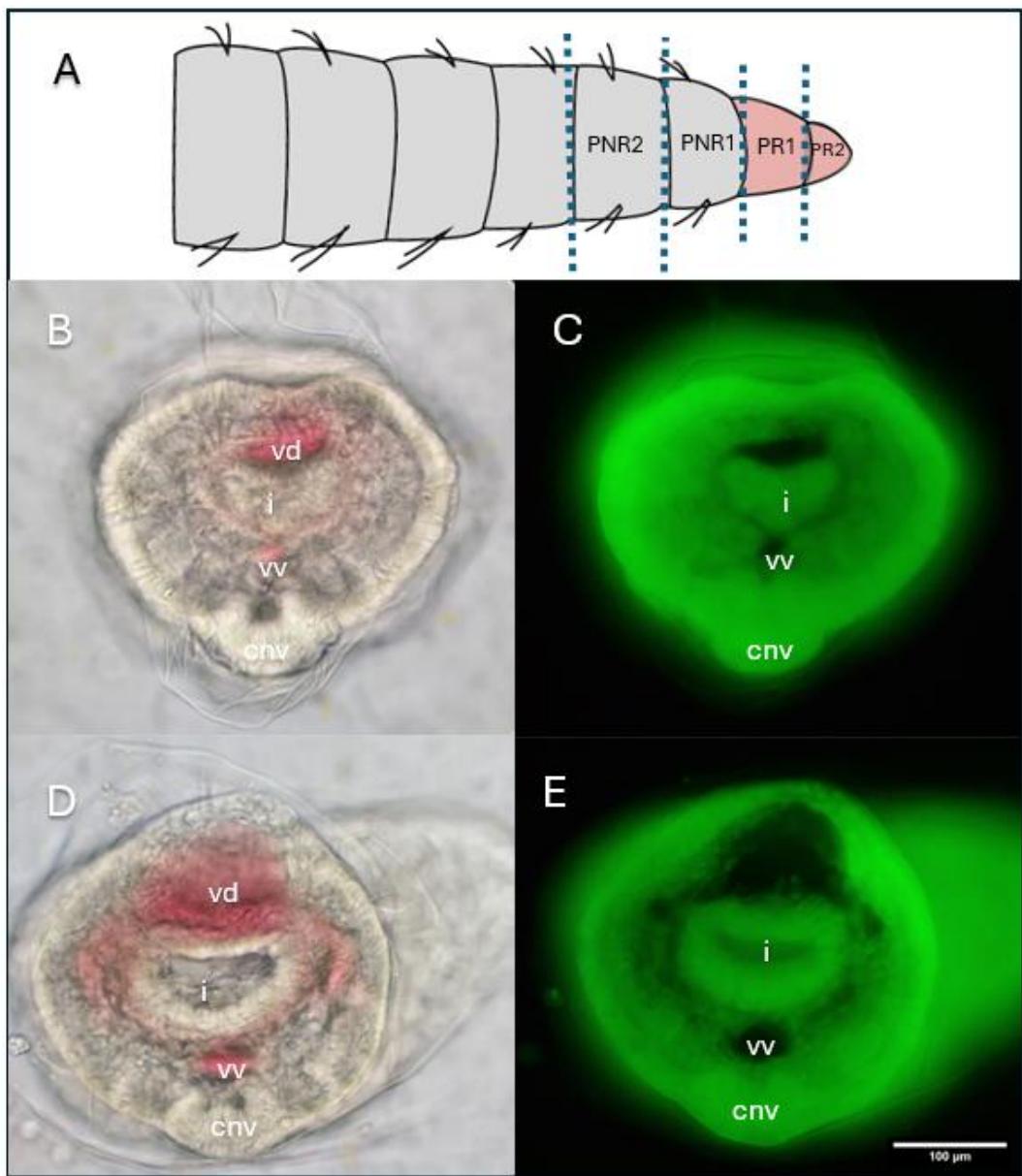


Figura 20. Cortes de región regenerante posterior de 120 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PR2(B y C) y PR1(D y E). (B) PR2 es la región extrema del blastema; (C) PR2 la región extrema del blastema observada bajo filtro de fluorescencia; (D) PR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo; (E) PR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia; cnv, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

En las regiones correspondientes al cuerpo, la estructuración de los tejidos se mantuvo. Se encontró el intestino rodeado de músculo y un amplio celoma. La presencia de las venas ventral y dorsal fue más evidente sin tinción (Fig. 21B y D). En PNR1 y PNR2 fue evidente la señal marcada por la tinción de la mielina. (Fig. 21C y E).

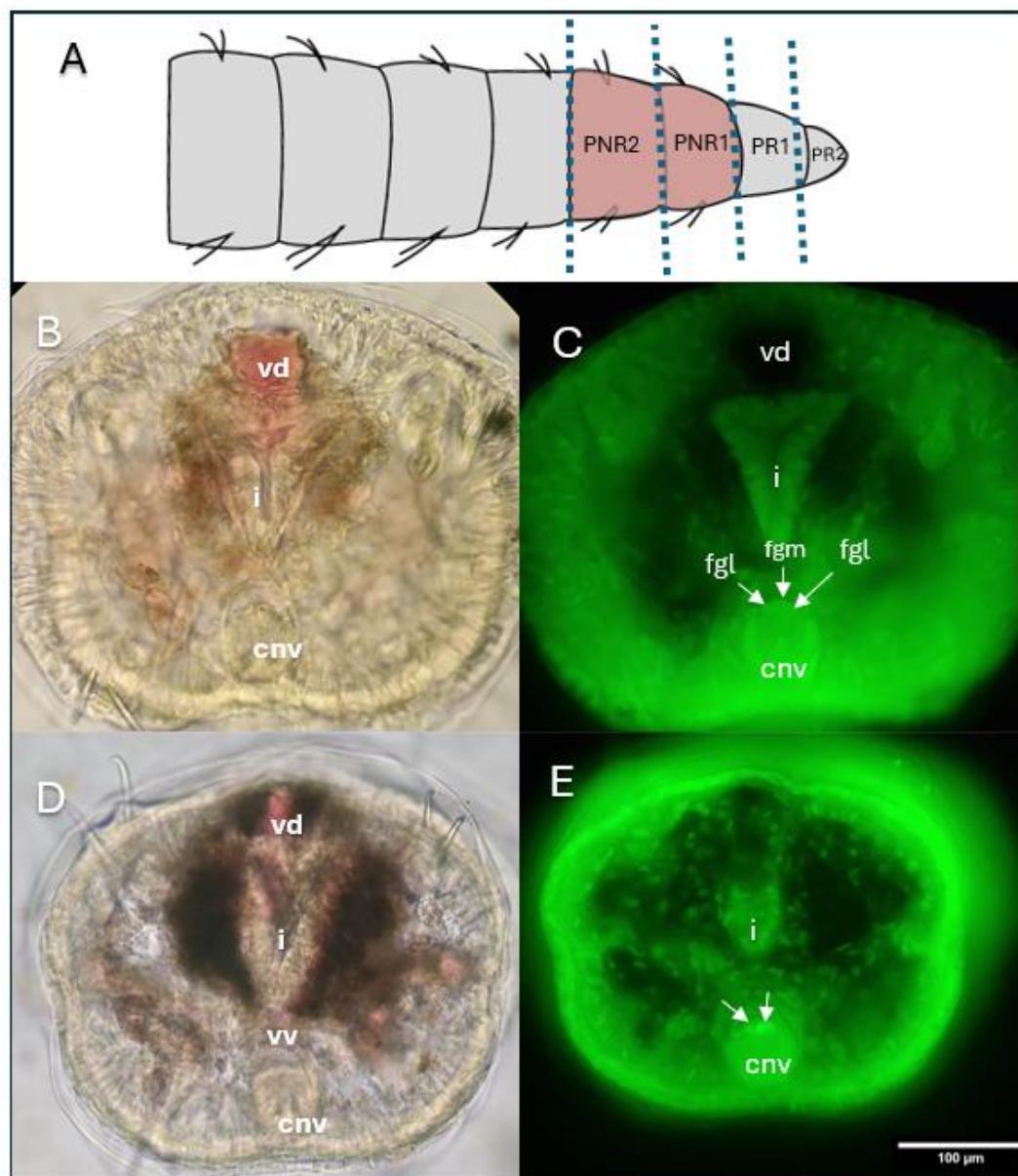


Figura 21. Cortes de región no regenerante posterior de 120 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PNR1(B y C) y PNR2(D y E).

(B) PRN1, es la región más cercana al blastema; (C) PRN1, más cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; (D) PRN2, más cercana al resto del cuerpo; (E) PRN2, más cercana al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

#### Morfología posterior 144 hpa:

A esta temporalidad los cortes de PR2 permitieron hacer una diferenciación estructural de los tejidos. El intestino se localizó centrado y no fue posible observar los tejidos musculares que comúnmente se habían observado (Fig. 17B; 18B y 19B). Las venas dorsal y ventral sí estuvieron delimitadas y se observó el cordón nervioso que se integraba al resto del tejido en la región dorsal, restringiendo el abultamiento característico observado en los cortes de temporalidad pasada (Fig. 22B); pero que de esta forma le confirió una estructura semi ovalada (Fig. 22). No se distinguieron las fibras gigantes y no se encontró señal de mielina (Fig. 22C).

Los cortes pertenecientes a la región del cuerpo PR1 permitieron observar una estructuración definida: intestino, venas dorsal y ventral. El cordón nervioso se acabó de integrar, evitando el abultamiento dado en la región dorsal, por lo que la pared queda constituida de forma ovalada (Fig. 22 D) y dentro del cordón nervioso se comenzó a percibir la señal de mielina en algunas de las fibras gigantes (Fig. 22E).

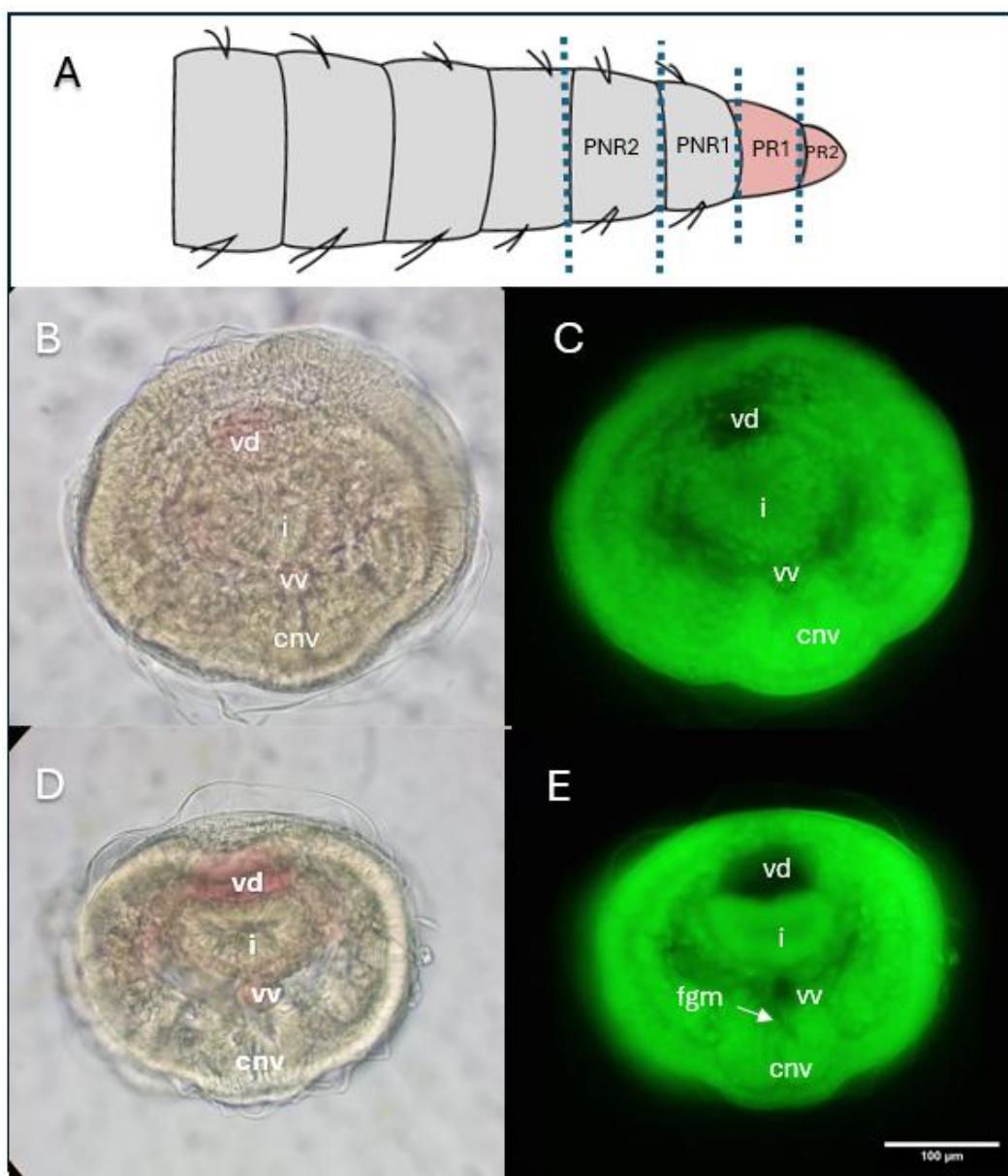


Figura 22. Cortes de región regenerante posterior de 144 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PR2(B y C) y PR1(D y E). (B) PR2 es la región extrema del blastema; (C) PR2 la región extrema del blastema observada bajo filtro de fluorescencia; (D) PR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo; (E) PR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de la mielina en las fibras gigantes; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

En las regiones PNR1 Y PNR2 no se encontró una distinción aparente y fueron perdiendo la forma ovalada o redondeada. Se reconocieron el intestino, recubierto por músculo bien desarrollado, y las venas ventral y dorsal en ambos cortes (Fig. 23B y D). Fue posible observar la organización del cordón nervioso y se distinguió marcadamente la señal de mielina en las fibras gigantes (Fig. 23 C y E).

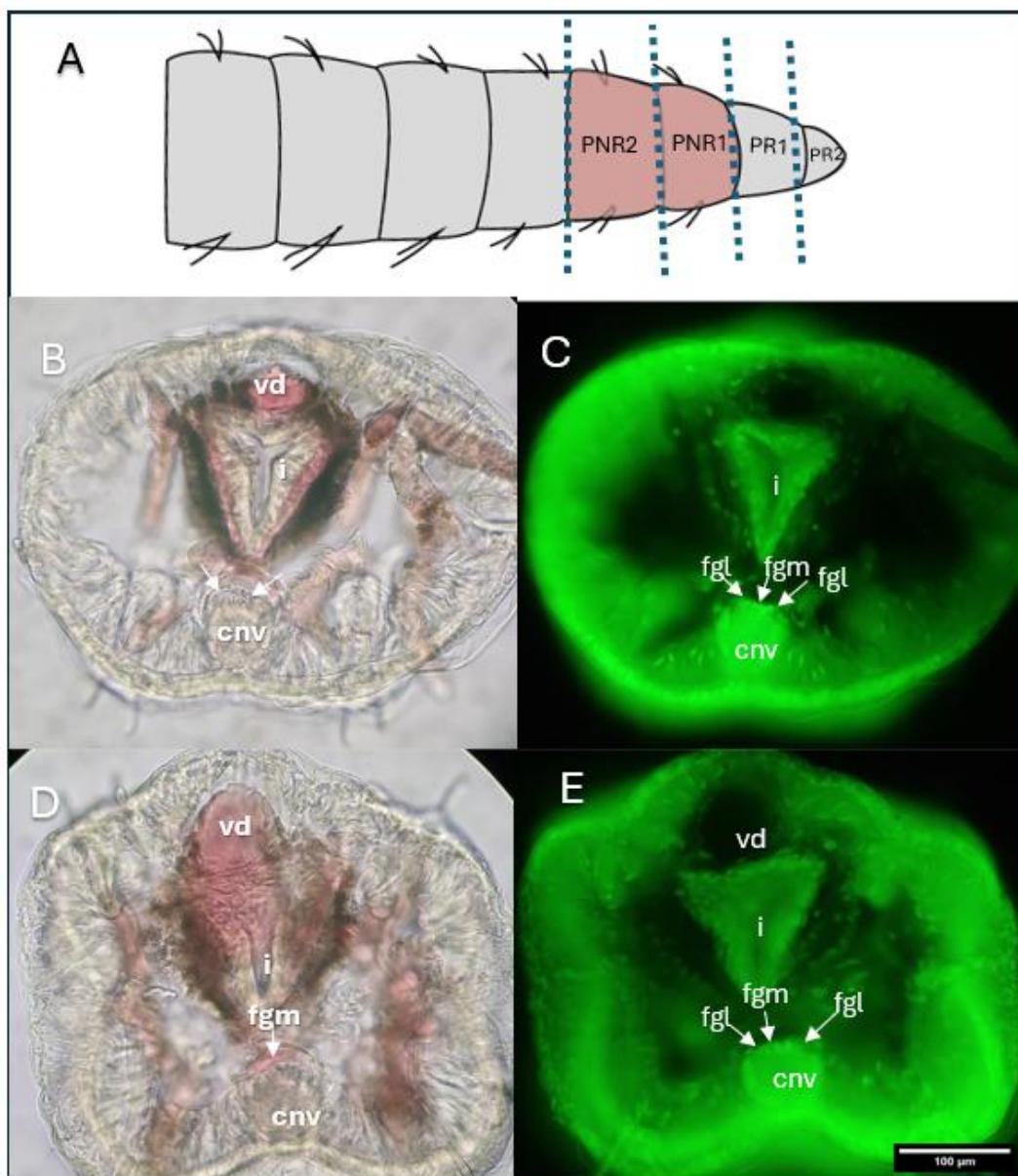


Figura 23. Cortes de región no regenerante posterior de 144 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PNR1(B y C) y PNR2(D y E). (B) PRN1, es la región más cercana al blastema; (C) PRN1, más cercana al blastema

observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de la mielina en las fibras gigantes; (D) PRN2, más cercana al resto del cuerpo, se puede observar la fibra gigante media; (E) PRN2, más cercana al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de la mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

#### Morfología posterior 168 hpa:

En PR2 la orientación dorsoventral fue sencilla. El intestino adquirió forma triangular, dirigiendo una de sus esquinas de forma dorsal hacia el cordón nervioso. El tejido muscular fue poco. Se distinguieron la vena ventral y la vena dorsal. El cordón nervioso también fue aparente (Fig. 24B) por su forma en “w” y no se percibió señal de mielina ni presencia de las fibras gigantes (Fig. 24C). En PR1 los cortes mantuvieron la organización. El intestino de igual forma fue adquiriendo una forma triangular. El tejido muscular fue escaso y poco definido, y el cordón nervioso fue distingible del resto de tejidos en la cavidad corporal (Fig. 24D). Dentro del cordón se percibió señal de baja intensidad, pero distingible que permitió reconocer la presencia de mielina en algunas fibras gigantes (Fig. 24E).

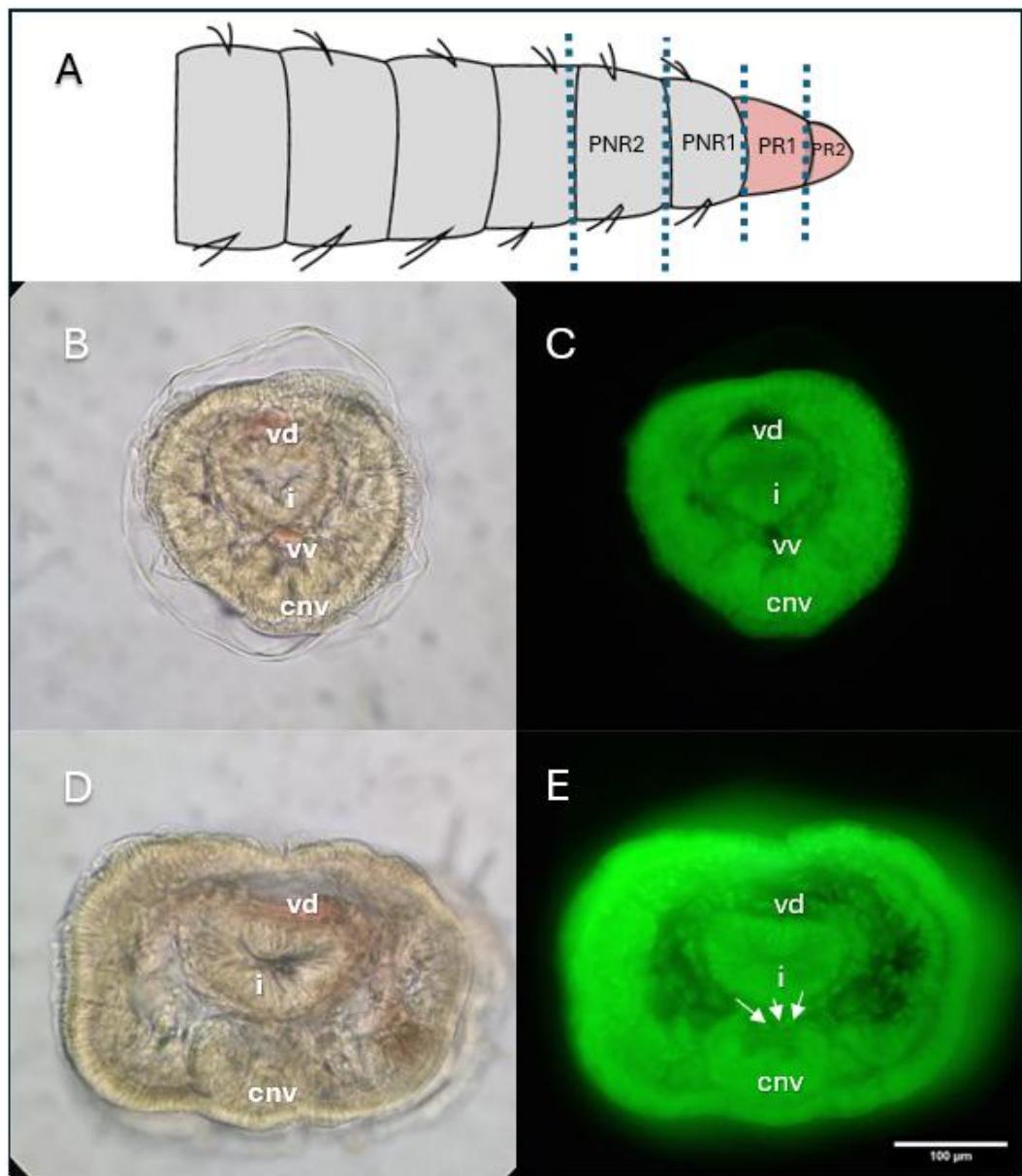


Figura 24. Cortes de región regenerante posterior de 168 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PR2(B y C) y PR1(D y E). (B) PR2 es la región extrema del blastema; (C)PR2 la región extrema del blastema observada bajo filtro de fluorescencia; (D) PR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo; (E) PR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican la ligera señal de mielina en las fibras gigantes; cnv, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

Las regiones PNR1 y PNR2 presentaron similitud en cuanto a su organización. Los tejidos presentaron la misma distribución y únicamente fueron distinguibles por la pigmentación, pues en PNR1 se observó poca pigmentación (Fig. 25B), mientras que PNR2 presentó la pigmentación café-rojiza natural que rodea los tejidos muscular e intestinal (Fig. 25D), como es normal en un corte de región media (Fig. 2). En ambas regiones se observó la señal de mielina en las fibras gigantes (Fig. 25 C y E).

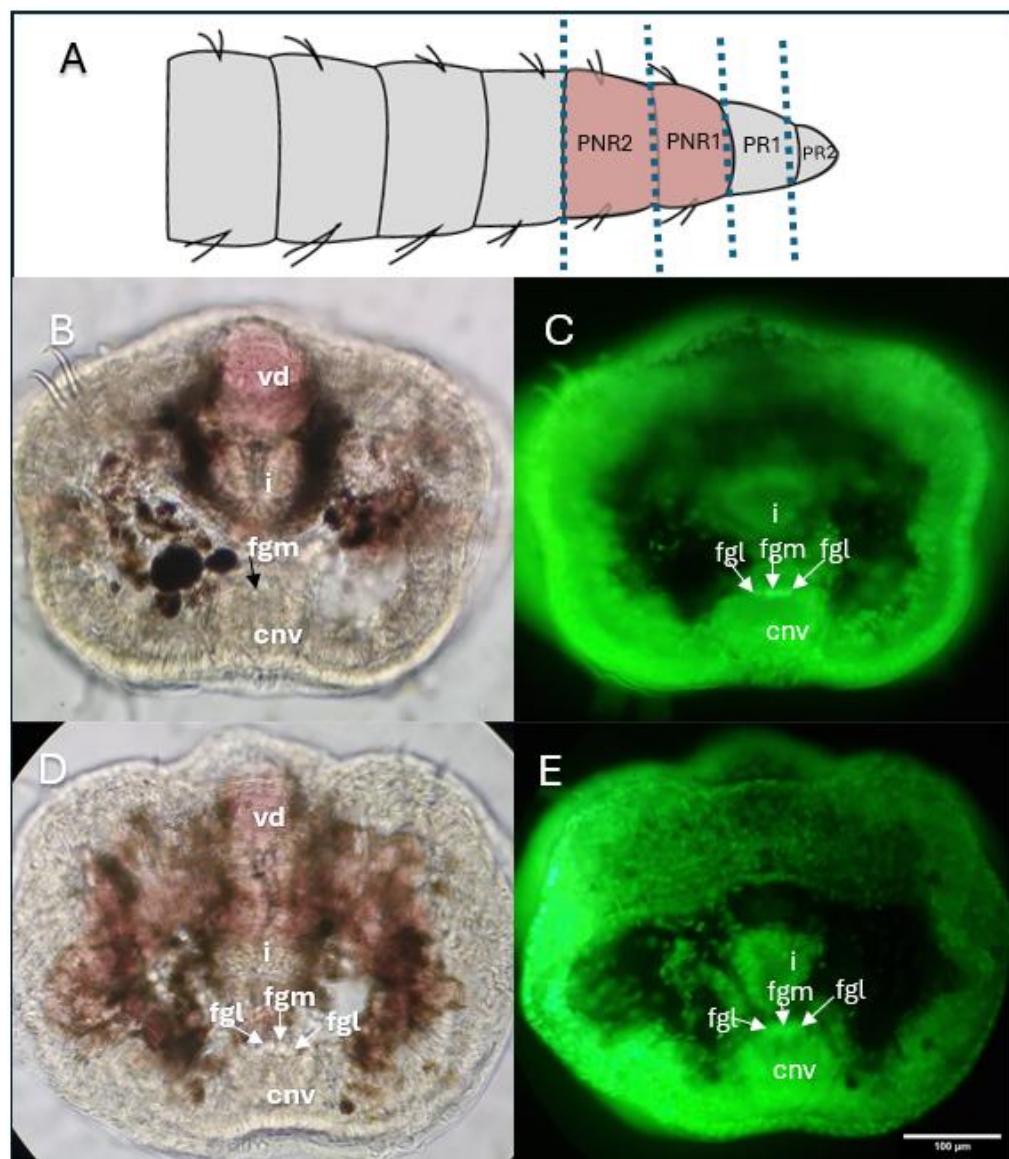


Figura 25. Cortes de región no regenerante posterior de 168 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PNR1(B y C) y PNR2(D y E).

(B) PRN1, es la región más cercana al blastema, se observa la fibra gigante media; (C) PRN1, más cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de las fibras gigantes; (D) PRN2, más cercana al resto del cuerpo, se puede observar la fibras gigantes; (E) PRN2, más cercana al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal.

Morfología posterior 192 hpa:

PR2 se pudo observar con mayor definición su organización. Se definió el intestino perdiendo la forma de media luna y el músculo que lo rodeaba comenzó a moverse hacia la pared corporal. Se distinguieron la vena dorsal y ventral, y se facilitó la distinción del cordón nervioso que presentaba la característica forma en “w” (Fig. 26B). Además, dentro del cordón nervioso se encontraron señales de baja intensidad que podrían representar el surgimiento de la mielina en los cordones nerviosos en esta región (Fig. 26C). En PR1 el intestino adoptó una forma triangular; el tejido muscular fue poco, pero se situó más hacia la pared corporal; las venas ventral y dorsal se encontraron definidas; y el cordón nervioso se distinguió con claridad entre el tejido (Fig. 26D). Fue posible identificar la señal para mielina en las fibras gigantes de esta región (Fig. 26E).

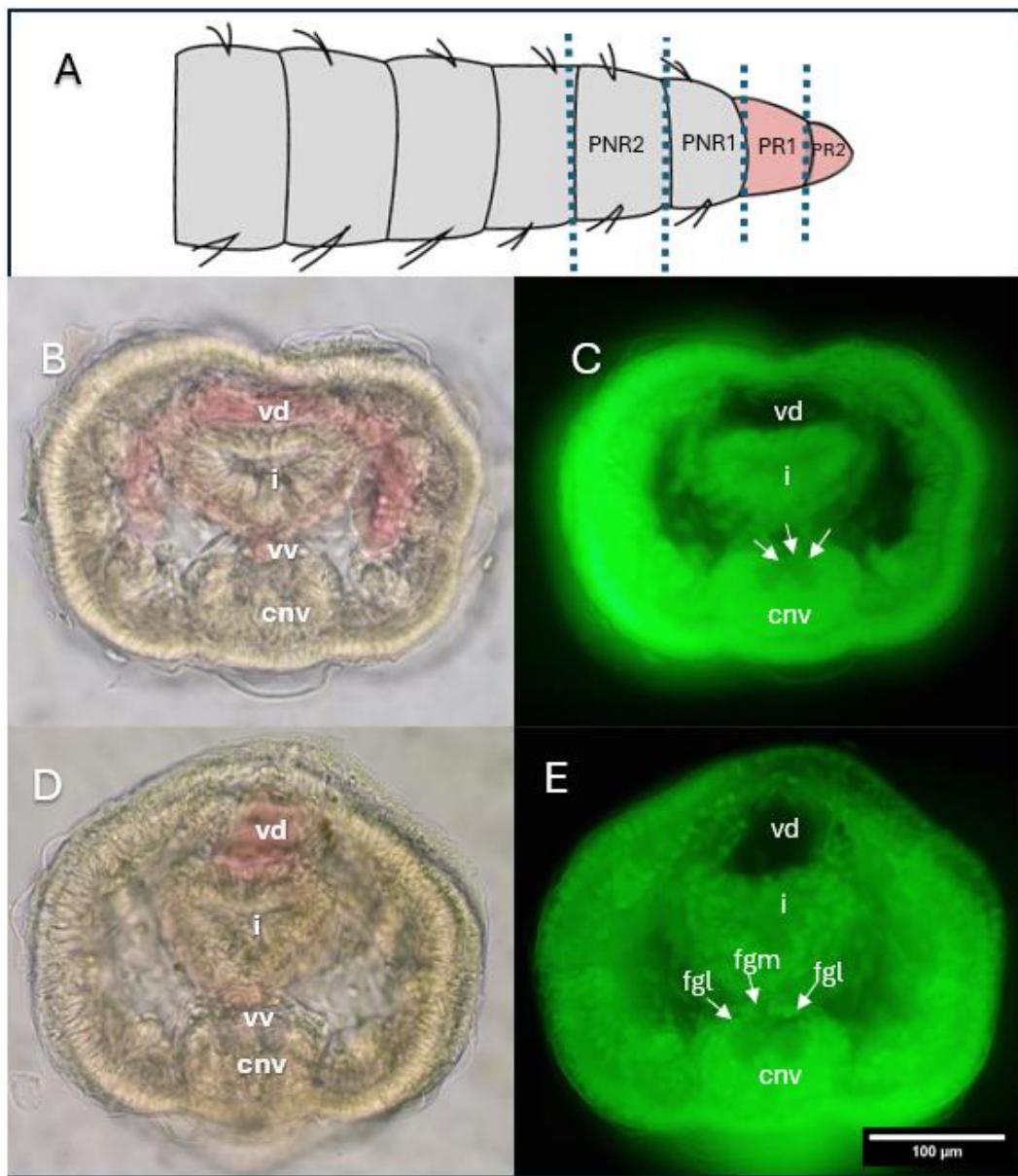


Figura 26. Cortes de región regenerante posterior de 168 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PR2(B y C) y PR1(D y E). (B) PR2 es la región extrema del blastema; (C)PR2 la región extrema del blastema observada bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican una baja señal de mielina en las fibras gigantes; (D) PR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo; (E) PR1, el blastema más cercano al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

Las regiones PNR1 y PNR2 presentaron similitud a un corte de región media (Fig. 2), por lo que los tejidos no presentaron modificaciones aparentes (Fig. 27 B y D). En ambas regiones se observó la señal de mielina en las fibras gigantes (Fig. 27 C y E).

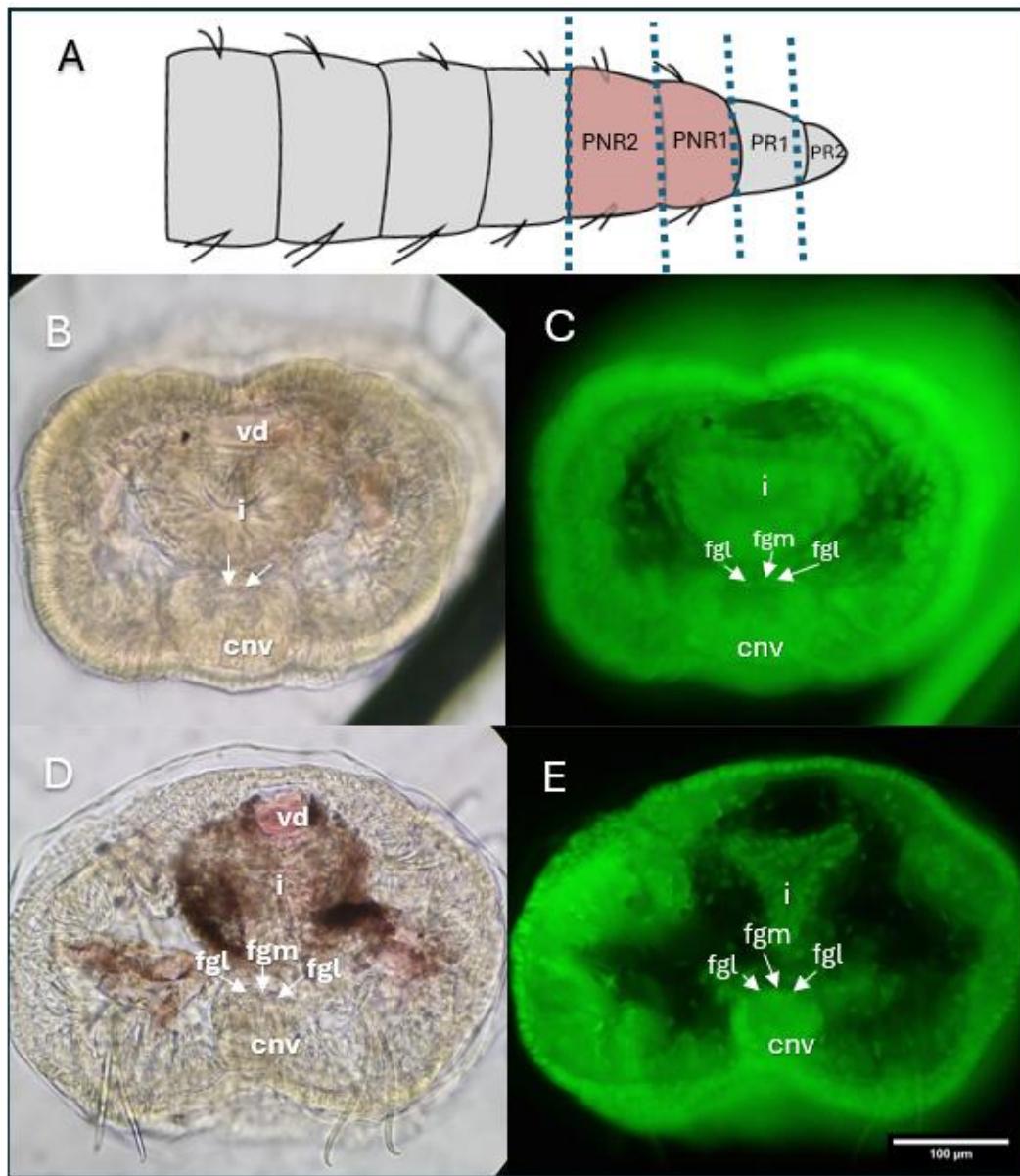


Figura 27. Cortes de región no regenerante posterior de 168 hpa. (A) Esquema de las regiones de corte; la zona en color representa los cortes; PNR1(B y C) y PNR2(D y E).

(B) PRN1, es la región más cercana al blastema, las flechas señalan la observación de las fibras gigantes; (C) PRN1, región más cercana al blastema observada bajo filtro de fluorescencia, las flechas indican la señal de mielina en las fibras gigantes; (D) PRN2, más cercana al resto del cuerpo, se puede observar la fibras gigantes; (E) PRN2, más cercana al resto del cuerpo bajo filtro de fluorescencia, se observa la señal de mielina en las fibras gigantes; *fgl*, fibra gigante lateral; *fgm*, fibra gigante media; *cnv*, cordón nervioso ventral; *i*, intestino; *vd*, vena dorsal; *vv*, vena ventral.

## DISCUSIÓN

### **Una temporalidad definida en la regeneración de la mielina e implicaciones en el proceso de regeneración de *L. variegatus*.**

En respuesta a la hipótesis planteada para este trabajo, se comprobó que existe una temporalidad determinada para la regeneración de la mielina, la cual está presente incluso antes de la organización de algunos tejidos como el intestino y el músculo, o antes del desarrollo de estructuras más complejas como la faringe, la boca ectodérmica y la ramificación de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, fue posible reconocer que la regeneración en la mielina ocurre antes de la etapa 3 en del proceso propuesto por Martínez et al. (2021) de una región, ya sea anterior o posterior; etapa en la que se observó que se desarrollan estructuras importantes como el ganglio cerebral, la faringe, neuritas y los anillos musculares circulares.

En consecuencia, esta observación también puede estar estrechamente relacionada con las investigaciones de regeneración hechas previamente para miembros del género *Lumbriculus*. Se ha observado que la regeneración de las extremidades tanto anterior como posterior requieren de una lesión o amputación del cordón nervioso, ya que el blastema comienza a formarse junto a esta zona (Martínez et al., 2021), con lo cual se podría especular que la mielina en las fibras gigantes de *L. variegatus* tiene una participación en el proceso de regeneración.

Esto tendría connotaciones importantes para entender en parte la biología del desarrollo y el proceso de regeneración celular, ya que nos guiaría a la respuesta de la pregunta planteada por Schweigreiter et al. (2006) “las características de mielinización ¿facilitan/inhiben la regeneración y la reparación?”. Con esta investigación la respuesta es que la mielina en esta temporalidad puede facilitar el proceso de regeneración, en base a su función, implica el surgimiento del impulso nervioso en los sitios de regeneración, posibilitando una respuesta rápida y una posible intervención en la organización de los tejidos.

La observación de que se presentara una ventana de tiempo anticipada para la regeneración de la mielina en la región anterior en comparación de la posterior podría estar relacionado también con la importancia y pronta necesidad del organismo de desarrollar una parte anterior o cabeza, por las estructuras complejas que requiere para su sobrevivencia, como los ganglios cerebrales, la boca y faringe.

### **Implicaciones evolutivas para el entendimiento de sistemas nerviosos mielinizados.**

Además de reafirmar la presencia de mielina en un organismo invertebrado como *L. variegatus*, como ya se había descrito por Drewes y Brinkhurst (1990) y Roots, (2008), se comprobó que la mielina regenera, proceso que no había sido estudiado en miembros del género *Lumbriculus*, pero que podría ser de importancia para comprender históricamente la adquisición de caracteres evolutivos convergentes. De acuerdo con Schweigreiter et al. (2006) se requiere de la investigación en muchos animales para la comprensión de la evolución en los sistemas nerviosos mielinizados, Estos estudios nos permitirán acercarnos al entendimiento de relaciones más sofisticadas implicadas en el mantenimiento de las fibras mielinizadas.

La comparación en la evolución de la mielina en distintos organismos podría estar relacionada en base a su función, ya que la forma en que se da la conducción del impulso nervioso es universal (Roots, 2008) y no estrictamente guiada por la composición, que es en donde se han descrito las principales diferencias (Hartline, 2008). La capacidad de un organismo para regenerar mielina tiene un impacto significativo, enfocándonos en el desarrollo, ya que se propone que la evolución de la mielina está vinculada con las células gliales (Roots 2008), lo que permite abarcar un entendimiento más extenso en la evolución y desarrollo de los sistemas nerviosos.

## **Implicaciones en la definición de mielina.**

Además de la propuesta de *L. variegatus* como modelo para el entendimiento del proceso evolutivo de regeneración, este trabajo podría aportar al entendimiento de la existencia de mielina en invertebrados, contribuyendo a la complementación del concepto sesgado que aún se tiene para definir a la mielina, el cual se describe como característica principal en vertebrados. Schweigreiter et al. (2006) mencionan que la mielina se encuentra mayormente en vertebrados y solo “una pequeña porción de axones de invertebrados están mielinizados”. Si dejamos de lado el sesgo de estudios en organismos invertebrados y redefinimos el término de mielina, no solo basado en su composición estructural, y lo enfocamos a las características funcionales, ampliaríamos la visión sobre el proceso evolutivo que tiene y ha tenido la mielina. La propuesta de ampliar este concepto no es nueva. Si bien Roots (2008) propone el redefinir la mielina como “una vaina de múltiples capas de membranas alrededor de los axones nerviosos que aumenta la velocidad de conducción”, lo que permite hacer una comparación de la presencia de mielina en distintos organismos, es importante la obtención de información sobre los mecanismos implicados en el desarrollo que permiten la regeneración y el surgimiento de la mielina de forma evolutiva en los distintos grupos de animales.

## ***L. variegatus* como organismo modelo.**

*L. variegatus* ya ha sido propuesto como modelo de estudio para entender aspectos importantes de la regeneración, tales como una alta capacidad de regeneración de segmentos, la formación de novo del cordón nervioso ventral y la capacidad para la transformación morfoláctica del sistema nervioso (Lesiuk y Drewes, 2001). A estas características podríamos atribuir la presencia de mielina, la regeneración de esta y la temporalidad en la que se presenta durante el proceso de regeneración del sistema nervioso. Aquí se propone que la mielina tiene funciones importantes que permiten concretar la regeneración de la región anterior o posterior.

Un aspecto a considerar en la propuesta de *L. variegatus* como organismo modelo es que se desconoce el mecanismo de respuestas nociceptivas (definido en los humanos como el dolor) (León, 1993). Los anélidos cuentan con células “N” que son consideradas como nociceptores, pero únicamente se ha estudiado la respuesta a aversión inducida en *L. terrestris* (Kavaliers, 2008). De este modo sería favorable estudiar a detalle los mecanismos implicados en la respuesta de *L. variegatus*.

Por otra parte, el emplear a *L. variegatus* como modelo para estudiar el proceso de regeneración de la mielina brinda ventajas importantes como lo son su fácil mantenimiento y manejo en el laboratorio, y el poco tiempo en el que se presenta esta regeneración, volviéndolo un modelo apto para indagar en el proceso de remielinización y afección axonal causante de defectos en el impulso nervioso. Por lo tanto, se podrían proponer futuras investigaciones que nos permiten un acercamiento a la comprensión de enfermedades como la esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (Podbielska et al., 2013), en la que se produce un daño neuroaxonal, una afección axonal y de la mielina que recubre estos axones (Fernández et al., 2015), causando defectos en la conducción del impulso nervioso (Domínguez et al., 2012; Pericot y Montalba, 2001). Aunque se han realizado múltiples estudios para comprender y tratar esta enfermedad, su origen sigue siendo desconocido y se considera como principal etiología una respuesta autoinmune (Fernández et al., 2015).

En la esclerosis múltiple se conoce que los factores que conducen a la progresión y a la discapacidad están relacionados con la falta de reparación en las lesiones, la remielinización incompleta y la neurodegeneración. La falta de conocimientos sobre estos factores a orillado a un tratamiento de la enfermedad principalmente en mecanismos inmunes (Díaz-Laviada, 2015; Torres et al., 2020). Por lo que este aporte en la investigación en la regeneración de la mielina se centraría en tratar la enfermedad como lo propone Podbielska et al. (2013) desde un enfoque neorregenerativo a partir de “La remielinización como verdadero proceso

regenerativo". En este proceso los axones desmielinizados son recubiertos de nuevas vainas de mielina.

El principal obstáculo al entendimiento del mecanismo de la esclerosis múltiple es que se presenta únicamente en humanos. En investigaciones actuales no existe un único modelo que permita entender los procesos en la enfermedad. Por lo que se requiere una variedad de modelos experimentales animales que permitan generar mayor conocimiento (Torres et al., 2020).

### **Resultados de la metodología utilizada.**

En las imágenes que aquí se muestran como parte del resultado, se observó la fluorescencia no solo de mielina si no de múltiples tejidos, ya que la tetraciclina al mantenerse bajo condiciones idóneas presenta unión a Ca<sup>2+</sup> haciendo el marcaje. Se ha observado la fluorescencia provocada por esta unión en mitocondrias cerebrales y en la mielina (Carvalho, 1978. En el trabajo de Pereyra y Roots (1998) se prueba el uso de tetraciclina como tinción histológica de los nervios mielinizados. Se ha confirmado la fluorescencia de tetraciclina en mielina de la lombriz de tierra, de roedores, anfibios y peces.

## **CONCLUSIÓN**

Las pruebas realizadas permitieron encontrar una ventana de tiempo en la que se hizo evidente la señal de la mielina en las fibras gigantes de *L. variegatus* antes de concluir el desarrollo de otras estructuras fundamentales para el funcionamiento adecuado de la región anterior o posterior.

En ambas regiones, tanto regeneración de la parte anterior como la regeneración de la parte posterior, la organización, estructuración y orientación en los tejidos del blastema en la temporalidad de 24 a 96 hpa, mostraron tener cambios aparentes en sus tejidos, pero se comenzaron a definir mejor a partir de las 120 hpa. En la parte anterior las orientación y región de los tejidos fue posible a partir de las 72 hpa, donde ya hay un surgimiento del cordón nervioso, mientras que, en la región posterior, la orientación y distinción de los tejidos fue evidente a partir de las 120 hpa, y el cordón nervioso fue evidente a las 120 hpa.

La regeneración de la mielina en las fibras gigantes de la región anterior se presentó de forma concreta en el blastema a partir de las 144 hpa, confirmada por los análisis en AR1; mientras que fue completa para todo el blastema a las 168 hpa, confirmando la identificación de la señal en los cortes AR2.

En la región posterior, la mielina en las fibras gigantes se evidenció a partir de las 168 hpa, identificándose la señal en la mielina en los cortes de PR1; pero se sustentó con mayor contundencia a partir de las 192 hpa, temporalidad en donde la señal ya se encontró en ambas regiones del blastema, incluidos los cortes de PR2.

## REFERENCIAS

- Anzaldúa Arce, S. R., Juárez Mosqueda, M. D., Villaseñor Gaona, H., Ríos Mas, M. C., Cornejo Cortés, M. Á., & Meraz Ríos, M. A. (2007). ¿Qué son las células troncales o células madre? *Veterinaria México*, 38(1), 81-104.
- Bely, A. E., & Nyberg, K. G. (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends in ecology & evolution*, 25(3), 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.08.005>
- Bely, A. E., Zattara, E. E., & Sikes, J. M. (2014). Regeneration in spiralian: evolutionary patterns and developmental processes. *The International journal of developmental biology*, 58(6-8), 623–634. <https://doi.org/10.1387/ijdb.140142ab>
- Carvalho C. A. (1978). Chlorotetracycline as an indicator of the interaction of calcium with brain membrane fractions. *Journal of neurochemistry*, 30(5), 1149–1155. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1978.tb12410.x>
- Chimal-Monroy, Jesus, Correa-Gallegos, Donovan & Galván-Hernández, Claudio. (2011). *Regeneración. Células troncales y medicina regenerativa*. Capítulo XI.
- Díaz-Laviada Mesa, R., (2015). Nuevas terapias en esclerosis múltiple: la remielinización como nueva estrategia terapéutica. [Trabajo fin de grado: Universidad Complutense]. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/66235>

Domínguez Moreno, Rogelio, Morales Esponda, Mario, Rossiere Echazarreta, Natalia Lorena, Olan Triano, Román, & Gutiérrez Morales, José Luis. (2012). Esclerosis múltiple: revisión de la literatura médica. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 55(5), 26-35.

Drewes, C. D. & Brinkhurst R. O. (1990) Giant nerve fibers and rapid escape reflexes in newly hatched aquatic oligochaetes, *Lumbriculus variegatus* (Family Lumbriculidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 17(2), 91-95, DOI: 10.1080/07924259.1990.9672095

Drewes, C. D., & Fourtner, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: reorganization of escape reflexes in regenerating body fragments. *Developmental biology*, 138(1), 94–103.  
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90179-m](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90179-m)

Drewes, C. D., Vining, E. P., & Zoran, M. J. (1988). Regeneration of rapid escape reflex pathways in earthworms. *American Zoologist*, 28(4), 1077–1089.  
<https://doi.org/10.1093/icb/28.4.1077>

Drewes, C., (2002). Functional organization of the nervous system in *Lumbriculus variegatus*.

<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=5eb8966ce8e0a2eb959d0c8216ea5bc649dd83d>

Duran, I. (2009). Modelos de regeneración. *Encuentros en la Biología*, 2(122)3-4.

Fernández O., Fernández V.E., Guerrero M., (2015). Multiple sclerosis. *Programa de Formación Médica Continuada Acreditada*, 11, 4610-4621.  
<https://doi.org/10.1016/j.med.2015.04.002>

Fragoso, C. y Rojas, P. (2021). Oligochaeta Grube, 1850. *Anélidos marinos de México y América tropical*. Editorial Universitaria Universidad Autónoma de Nuevo León.

Fragoso, C. y Rojas, P., (2014). Biodiversidad de lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta: Crassiclitellata) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, S197-S207. <https://doi.org/10.7550/rmb.33581>

Günther J. (1976). Impulse conduction in the myelinated giant fibers of the earthworm. Structure and function of the dorsal nodes in the median giant fiber. *The Journal of comparative neurology*, 168(4), 505–531.  
<https://doi.org/10.1002/cne.901680405>

Gustafsson D. R., Price D. A. y Erséus C. (2009). La variación genética en el popular gusano de laboratorio *Lumbriculus variegatus* (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae) revela una especiación críptica. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51, 82-189, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.12.016>

Hartline, D. (2008). What is myelin? *Neuron Glia Biology*, 4(2), 153-163. DOI: 10.1017/S1740925X09990263

Hartline, D. K., & Colman, D. R. (2007). Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Current Biology*, 17(1), R29–R35. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.042>

Kavaliers, M.,(1988). Evolutionary and comparative aspects of nociception, Brain Research Bulletin, 21,923-931,https://doi.org/10.1016/0361-9230(88)90030-5.

Koutsoudaki, P. N., Papadopoulos, D., Passias, P. G., Koutsoudaki, P., & Gorgoulis, V. G. (2020). Cellular senescence and failure of myelin repair in multiple sclerosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 192, 111366. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111366>

Kusano, K. (1966), Actividad eléctrica y correlatos estructurales de fibras nerviosas gigantes en camarones Kuruma ( Penaeus japonicus ). *Journal of Cellular Physiol.*, 68: 361-383. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040680315>

Kusano, K. and Lavail, M.M. (1971), Impulse conduction in the shrimp medullated giant fiber with special reference to the structure of functionally excitable areas. *Journal of Comparative Neuroscience.*, 142: 481-494. <https://doi.org/10.1002/cne.901420406>

Lemus, H. N., Warrington, A. E., & Rodriguez, M. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. *Neurologic Clinics*, 36(1), 1–11. 1 <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.08.002>

2

León, M., (1993). Los péptidos opioides y la filogenia de la nocicepción. *Ciencia*, 31, 32-38.

Lesiuk, N.M. and Drewes, C.D. (2001), Behavioral plasticity and central regeneration of locomotor reflexes in the freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. I: Transection studies. *Invertebrate Biology*, 120: 248-258. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2001.tb00035.x>

Lybrand ZR, Martinez-Acosta VG, Zoran MJ. Coupled sensory interneurons mediate escape neural circuit processing in an aquatic annelid worm, *Lumbriculus variegatus*. *J Comp Neurol.* 2020; 528: 468–480. <https://doi.org/10.1002/cne.24769>

Marchese, M. R., Santos, M. R., Lima, J. C. S., & Pamplin, P. (2015). First record of introduced species *Lumbriculus variegatus* Müller, 1774 (Lumbriculidae, Clitellata) in Brazil. *BioInvasions Records*, 4(2), 81–85. <https://doi.org/10.3391/bir.2015.4.2.02>

Martinez Acosta VG, Arellano-Carbajal F, Gillen K, Tween KA and Zattara EE (2021) It Cuts Both Ways: An Annelid Model System for the Study of Regeneration in the Laboratory and in the Classroom. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:780422. doi: 10.3389/fcell.2021.780422

Martínez, V. G., Menger, G. J., III, & Zoran, M. J. (2005). Regeneration and asexual reproduction share common molecular changes: Upregulation of a neural glycoepitope during morphallaxis in *Lumbriculus*. *Mechanisms of Development*, 122(5), 721–732. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.12.003>

Nawaz, S., Schweitzer, J., Jahn, O., & Werner, H. B. (2013). Molecular evolution of myelin basic protein, an abundant structural myelin component. *Glia*, 61(8), 1364–1377. <https://doi.org/10.1002/glia.22520>

O'Gara, B. A., Bohannon, V. K., Teague, M. W., & Smeaton, M. B. (2004). Copper-induced changes in locomotor behaviors and neuronal physiology of the freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 69(1), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.006>

Özpolat, B. D., & Bely, A. E. (2016). Developmental and molecular biology of annelid regeneration: A comparative review of recent studies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 40, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.07.010>

Pereyra, Pedro M., & Roots, Betty I., (1988). The use of tetracycline hydrochloride as a rapid fluorescent stain for myelin membranes in vertebrates and invertebrates. *Brain Research*, 458, 377-382.

Pérez M. y Lotenti A., (2006). Células troncales (STEM CELLS) y regeneración cardiaca. *MEDICINA* 66, 574-582.

Pericot I., & Montalba X.,(2001). Esclerosis Múltiple. *Medicina integral*. 38 (1), 18-24.

Pickavance, J., (2011). The ecology of *Lumbriculus variegatus* (Müller) (Oligochaeta, Lumbriculidae) in Newfoundland. *Canadian Journal of Zoology*. 49, 337-342. <https://doi.org/10.1139/z71-049>

Podbielska, M., Banik, N. L., Kurowska, E., & Hogan, E. L. (2013). Myelin Recovery in Multiple Sclerosis: The Challenge of Remyelination. *Brain Sciences*, 3(3), 1282-1324. <https://doi.org/10.3390/brainsci3031282>

Purschke, G. (2015). “*Annelida: Basal Groups and Pleistoannelida*,” in Structure and Evolution of Invertebrate Nervous Systems. Editors A. Schmidt-Rhaesa, S. Harzsch, and G. Purschke (Oxford: Oxford University Press), 254–312. doi:10.1093/acprof:oso/9780199682201.003.0024

Quispe-Parra, D. (2019). Biología del desarrollo: la capacidad regenerativa de Holothuria glaberrima. *Revista Tecnología En Marcha*, 32(8), 126–136. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i8.4570>

Roots, B. (2008). The phylogeny of invertebrates and the evolution of myelin. *Neuron Glia Biology*, 4(2), 101-109. <https://doi.org/10.10S1740925X0900012X>

Roots, B. I., & Lane, N. J. (1983). Myelinating glia of earthworm giant axons: thermally induced intramembranous changes. *Tissue & cell*, 15(5), 695–709. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(83\)90044-7](https://doi.org/10.1016/0040-8166(83)90044-7)

Rosa, R., Bordalo, M., Soares, A. y Pestana, J. (2016). Effects of the Pyrethroid Esfenvalerate on the Oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 96, 438–442. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1718-y>

Sanches, N. A. O., Girolli, D. A., Lima, M. F., Gorni, G. R., & Corbi, J. J. (2021). *Lumbriculus variegatus* (Müller, 1774) (Oligochaeta, Lumbriculidae) in Campos do Jordão State Park, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 83(e247913). <https://doi.org/10.1590/1519-6984.247913>

Sardo, A. M., Soares, A. M. V. M. and Gerhardt, A.(2007)'Behavior, Growth, and Reproduction of *Lumbriculus Variegatus* (Oligochaetae) in Different Sediment Types. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 13:3,519.

Schweigreiter, R., Roots, B. I., Bandtlow, C. E., y Gould, R. M. (2006). Understanding myelination through studying its evolution. *International Review of Neurobiology*, 73, 219–273. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)73007-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)73007-0)

Seeley, A., Bellamy, C., Davies, N.A., Wallace, M.J., (2021). *Lumbriculus variegatus*: A novel organism for in vivo pharmacology education. *Pharmacol Res Perspect*; 9:e00853. <https://doi.org/10.1002/prp2.853>

Téllez, A. A.(2022). Análisis transcriptómico y participación de la vía canónica de Wnt en la regeneración de *Lumbriculus variegatus*. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional DGBSDI-UAQ.

Tellez-Garcia, A. A., Álvarez-Martínez, R., López-Martínez, J. M., & Arellano-Carbajal, F. (2021). Transcriptome analysis during early regeneration of *Lumbriculus variegatus*. *Gene Reports*, 23, 101050. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101050>

Thorp, J. y Covich, A. (1991). The Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. *Journal of the North American Benthological Society*. <https://doi.org/10.2307/1467674>

Torre-Fuentes, L., Moreno-Jiménez, L., Pytel V., Matías-Guiu, J. A., Gómez-Pinedo, U., Matías-Guiu, J., (2020). Modelos experimentales de desmielinización-remielinización, *Neurología*, 35, 32-39, <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.07.002>.

Werner H. B. (2013). Do we have to reconsider the evolutionary emergence of myelin?. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 217. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00217>

Zattara, E. E. (2020). Axial Regeneration in Segmented Animals: A Post-Embryonic Reboot of the Segmentation Process. *Cellular Processes in Segmentation Evolutionary Cell Biology*, 255–292. doi:10.1201/9780429423604-13

Zattara, E.E. & Bely, A.E. (2016), Phylogenetic distribution of regeneration and asexual reproduction in Annelida: regeneration is ancestral and fission evolves in regenerative clades. *Invertebr Biol*, 135: 400-414. <https://doi.org/10.1111/ivb.12151>

Zoran, M. (2010). Regeneration in Annelids. Encyclopedia of life sciences. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022103>

Zrzavý, J., Říha, P., Piálek, L. et al. Filogenia de Annelida (Lophotrochozoa): análisis de evidencia total de morfología y seis genes. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-189>