



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Mecanismos epigenéticos que regulan la regeneración del oligoqueto acuático
Lumbriculus variegatus

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Microbiología

Presenta:

Juana María López Martínez

Director de tesis:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Santiago de Querétaro, Qro. Marzo 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Mecanismos epigenéticos que regulan la regeneración del oligoqueto acuático
Lumbriculus variegatus

Opción de titulación
Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado
de Licenciado en Microbiología

Presenta:

Juana María López Martínez

Dirigido por:

Fausto Arellano Carbajal

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Presidente

Firma

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse
Sinodal

Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Sinodal

Firma

Dr. Roberto Carlos Álvarez Martínez
Sinodal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Marzo 2020

RESUMEN

La epigenética es el término que hace referencia a la regulación de la expresión génica producto de modificaciones que no alteran la secuencia del ADN. Las marcas más estudiadas en función y localización son las metilaciones. Dentro de los distintos grupos taxonómicos estas marcas ejercen distintas funciones. En vertebrados las metilaciones están asociadas principalmente con supresión génica. Por otro lado, en invertebrados desempeñan un papel importante en la activación génica, además de que participan en procesos como el empalme alternativo. Existen múltiples compuestos que pueden alterar el patrón epigenético, como el ácido fólico, que favorece la metilación ya que es un importante donador de grupos metilo para reacciones de metilación. Otro agente que puede alterar los patrones epigenéticos es la 5-aza-2'-desoxicitidina, un análogo de nucleósido empleado como inhibidor de metiltransferasas. El objetivo de este trabajo fue determinar cuál es el papel de las metilaciones en la regeneración anterior y posterior de *Lumbriculus variegatus*, un oligoqueto acuático que presenta regeneración anterior y posterior, con dos tipos: la regeneración epimórfica y la morfoláctica. Se documentó el proceso de regeneración durante los primeros 14 días y se determinó el efecto de la administración de ácido fólico y del inhibidor de metiltransferasas, la 5-aza-2'-desoxicitidina. Se encontró que la administración de 0.1 mg/ml de ácido fólico favoreció la regeneración únicamente algunos días entre el día dos y el día siete. Por otro lado, la administración durante 14 días consecutivos de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina disminuyó la regeneración a partir del día tres post-amputación. Este trabajo genera conocimiento sobre la importancia de las metilaciones en la regulación de la expresión génica durante la regeneración de *Lumbriculus variegatus*.

(**Palabras clave:** regeneración, metilación, morfolaxis, epimorfosis, ácido fólico, 5-aza-2'-deoxicitidina)

SUMMARY

Epigenetics refers to the regulation of gene expression that does not alter the DNA sequence. The most studied epigenetic marker in terms of its function is DNA methylation. Within different taxonomic groups, these epigenetic markers have different functions. In vertebrates, they are associated with gene suppression. On the other hand, in invertebrates methylations play an important role in gene activation and participate in other processes as alternative splicing. There are several compounds that can alter DNA methylation, such as folic acid, a compound that favors methylation because it is a donor of methyl groups for the methylation reaction, and 5-aza-2'-desoxycytidine, a nucleoside analogue used as methyltransferase inhibitor. The aim of this thesis was to determine the role of DNA methylations in the anterior and posterior regeneration of *Lumbriculus variegatus*, an aquatic oligochaete that has an anterior and posterior regeneration in two forms: epimorphic and morphalactic. I describe the regeneration process that occurred during the first 14 days and determined the effect of the administration of folic acid and the methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. The administration of 0.1 mg/ml of folic acid favored the regeneration only some days between second day post-amputation and seven day post-amputation. On the other hand, administration of 100 μ M of 5-aza-2'-deoxycytidine for 14 consecutive days decreased regeneration since the third day post-amputation. This work offers new knowledge about the role of methylations in the regulation of gene expression during the regeneration of *Lumbriculus variegatus*.

(**Key words:** regeneration, methylation, morphalaxis, epimorphosis, folic acid, 5-aza-2'-deoxycytidine)

Dedicatorias

A mis padres, por el amor y su apoyo incondicional durante mi formación

*A mi hermano, por ser mi mejor amigo y por sacarme una sonrisa siempre que
estoy contigo*

*A Fausto, por permitirme ser parte de este proyecto, por la confianza y por todas
sus enseñanzas*

A mis maestros por todos sus consejos y apoyo

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A mis padres. Papá, pese a que no vas a poder leer este trabajo, gracias porque junto con mamá me daban mucho más de lo que podían, por ser abrazo cálido en días tristes y por celebrar conmigo los días alegres. A mi mamá, por ser una persona extraordinaria. Muchas gracias por apoyarme en todo momento y circunstancia, por todos tus valiosos consejos y por ser la única que tenía las palabras indicadas en cualquier ocasión.

A mi hermano, gracias por alegrar mis días y ser cómplice de aventuras.

A Fausto, por ser un gran director de tesis. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por fomentar en nosotros esa pasión por la ciencia que te caracteriza, por todo lo que aprendí en este proyecto, por tus consejos y tu apoyo.

A la Dra. Karina, por su hospitalidad en mi estancia en el laboratorio. Gracias por formar parte de mi comité, por el tiempo otorgado en la revisión de este trabajo y por todos tus consejos.

A la Dra. Angelina y al Dr. Roberto, gracias por ser parte de mi comité, por el tiempo otorgado para la revisión de este trabajo, por sus valiosos comentarios y por todos sus consejos.

A mis compañeros del laboratorio. Aldo, gracias por el apoyo en los experimentos realizados y por compartir tus conocimientos en estadística y programación.

A mis amigos de la universidad y de la infancia, por su apoyo incondicional. Gracias a cada una de sus familias que nos recibieron cordialmente cuando necesitábamos trabajar juntos.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
INDICE DE TABLAS	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 EPIGENÉTICA	14
2.2 ÁCIDO FÓLICO Y SU PAPEL COMO AGENTE METILANTE.....	16
2.3 INHIBIDORES DE METILACIÓN	18
2.4 REGENERACIÓN	20
2.5 ANÉLIDOS.....	21
2.6 MODELO DE ESTUDIO, <i>LUMBRICULUS VARIEGATUS</i>	22
2.7 REGENERACIÓN EN INVERTEBRADOS Y EL PAPEL DE LA METILACION	24
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 DECLARACIÓN BIOÉTICA	29
5.2 OBTENCIÓN DE LA ESPECIE.....	29
5.3 MANTENIMIENTO Y ESTABILIZACIÓN DE LAS PECERAS.	29
5.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	29
5.5 GENERACIÓN DE CÁMARAS PARA VISUALIZACIÓN DE REGENERACIÓN	30
5.6 EFECTO DEL ÁCIDO FÓLICO EN LA REGENERACIÓN DE <i>LUMBRICULUS VARIEGATUS</i>	31
5.6.1 Prueba toxicológica de NaOH.....	31
5.6.2 Administración de 0.05 mg/ml de ácido fólico y 0.001 M de NaOH en oligoquetos regenerando	31
5.6.3 Administración de 0.1 mg/ml de ácido fólico y 0.0001 M de NaOH en oligoquetos regenerando	32

5.7	EFFECTO DE LA 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA EN LA REGENERACIÓN ANTERIOR Y POSTERIOR DEL	
	LUMBRICULUS VARIEGATUS	33
5.7.1	<i>Prueba toxicológica del DMSO</i>	33
5.7.2	<i>Efecto de 30 µM de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de Lumbriculus variegatus</i>	33
5.7.3	<i>Efecto de 100 µM de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de Lumbriculus variegatus</i>	34
5.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
5.8.1	<i>Pruebas toxicológicas</i>	34
5.8.2	<i>Análisis de imágenes obtenidas en los ensayos</i>	34
5.8.3	<i>Análisis estadístico</i>	35
6.	RESULTADOS	36
6.1	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE REGENERACIÓN DE LUMBRICULUS VARIEGATUS	36
6.2	EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE 0.05 MG/ML DE ÁCIDO FÓLICO EN LA REGENERACIÓN ANTERIOR Y POSTERIOR DE LUMBRICULUS VARIEGATUS	46
6.3	EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE 0.1 MG/ML DE ÁCIDO FÓLICO EN LA REGENERACIÓN ANTERIOR Y POSTERIOR DE LUMBRICULUS VARIEGATUS	51
6.4	EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE 30 µM 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA EN LA REGENERACIÓN ANTERIOR Y POSTERIOR	56
6.5	EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE 100 µM 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA EN LA REGENERACIÓN ANTERIOR Y POSTERIOR	61
7.	DISCUSIÓN	71
8.	CONCLUSIONES	76
9.	REFERENCIAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo del Ácido Fólico.....	17
Figura 2. Mecanismo de acción de los fármacos análogos a nucleósidos..	19
Figura 3. Modelo de estudio, <i>Lumbriculus variegatus</i> ..	23
Figura 4. Indicios de fisión en <i>Lumbriculus variegatus</i>	30
Figura 5. Cámara para visualización de la extremidad anterior.....	30
Figura 6 Regeneración anterior de <i>Lumbriculus variegatus</i> durante las primeras	39
Figura 7. Regeneración posterior de <i>Lumbriculus variegatus</i> , durante las primeras 20 horas.....	40
Figura 8. Regeneración del sistema circulatorio en <i>Lumbriculus variegatus</i>	41
Figura 9. Regeneración de protostomio/peristomio en <i>Lumbriculus variegatus</i> ..	42
Figura 10. Regeneración posterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	43
Figura 11. Segmentación de <i>Lumbriculus variegatus</i>	44
Figura 12. Pigmentación de la región posterior.....	45
Figura 13. Efecto de la administración de 0.05 mg/ml de Ácido fólico en la regeneración anterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	48
Figura 14. Efecto de la administración de 0.05 mg/ml de ácido fólico en la regeneración posterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	49
Figura 15. Efecto de la administración de 0.05 mg/ml de Ácido fólico en la regeneración de <i>Lumbriculus variegatus</i> (tasa de regeneración).....	50
Figura 16. Efecto de la administración de 0.1 mg/ml de ácido fólico en la regeneración anterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	53

Figura 17. Efecto de la administración de 0.1 mg/ml de ácido fólico en la regeneración posterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	54
Figura 18. Efecto de la administración de 0.1 mg/ml de Ácido fólico en la regeneración de <i>Lumbriculus variegatus</i> (tasa de regeneración).....	55
Figura 19. Efecto de la administración de 30 μ M 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	58
Figura 20. Efecto de la administración de 30 μ M 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración posterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	59
Figura 21. Efecto de la administración de 30 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de <i>Lumbriculus variegatus</i> (tasa de regeneración).....	60
Figura 22. Efecto de la administración de 100 μ M 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	64
Figura 23. Efecto de la administración de 100 μ M 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración posterior de <i>Lumbriculus variegatus</i>	65
Figura 24. Efecto de la administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de <i>Lumbriculus variegatus</i> (tasa de regeneración).....	66
Figura 25. Efecto de la administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior de <i>Lumbriculus variegatus</i> (número mínimo de muestra)...	68
Figura 26. Efecto de la administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración posterior de <i>Lumbriculus variegatus</i> (número mínimo de muestra).	69
Figura 27. Efecto de la administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de <i>Lumbriculus variegatus</i> (número mínimo de muestra).....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regeneración de la extremidad anterior.....	36
Tabla 2. Regeneración de la extremidad posterior.....	37
Tabla 3. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo de 0.05 mg/ml de ácido fólico...47	
Tabla 4a y 4b. Resultados del análisis por día, bioensayo de 0.05mg/ml de ácido fólico.....	47
Tabla 5. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo 0.1 mg/ml de ácido fólico.....	52
Tabla 6a y 6b. Resultados del análisis por día, bioensayo 0.1 mg/ml de ácido fólico.....	52
Tabla 7. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo de 30 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina.....	57
Tabla 8a y 8b. Resultados análisis por día, bioensayo de 30 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina.....	57
Tabla 9. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (5 réplicas).....	63
Tabla 10a y 10b. Resultados del análisis por día, bioensayo 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (5 réplicas).....	63
Tabla 11. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (10 réplicas).....	67
Tabla 12a y 12b. Resultados del análisis por día, bioensayo de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (10 réplicas).....	67

1. INTRODUCCIÓN

La epigenética es el término que hace referencia a cambios en la regulación de la expresión génica, producto de modificaciones que no alteran la secuencia del ADN (Moore et al., 2013). Actualmente se conocen múltiples marcas epigenéticas dentro de las cuales podemos destacar modificación de histonas, metilación del ADN y ARNs no codificantes (Crider et al., 2012). Las metilaciones del ADN son las marcas más estudiadas en función y localización, que varían en ubicación en los diferentes grupos taxonómicos (Zemach et al., 2010). El genoma de los vertebrados presenta una gran cantidad de metilaciones y estas están asociadas mayoritariamente a regiones promotoras, regiones no codificantes y regiones repetitivas, dentro de las cuales exhiben un papel importante en la supresión de genes (Gardiner-Garden y Frommer, 1987; Lister et al., 2009). En comparación con el genoma de vertebrados, los invertebrados presentan bajos niveles de metilación y estas marcas suelen encontrarse en mayor proporción en la región intragénica (Suzuki y Bird, 2008; Zemach et al., 2010; Sarda et al., 2012). Existen múltiples compuestos que pueden alterar el patrón epigenético, algunos de estos son fármacos sintetizados para fines terapéuticos y otros pueden encontrarse de forma cotidiana en alimentos. Dentro de estos encontramos al ácido fólico, compuesto que favorece la metilación ya que es un donador de grupos metilo para la síntesis del cofactor S-adenosil metionina implicado en las reacciones de metilación (Crider et al., 2012). Por otra parte, también podemos encontrar inhibidores de metiltransferasas, compuestos que se clasifican en análogos de nucleósidos y no análogos (Gros et al., 2012; López et al., 2016). Este último grupo incluye a la 5-aza-2'-desoxicitidina (Decitabina), un fármaco empleado en tratamiento contra el cáncer que inhibe la metilación ya que, al incorporarse al ADN, genera un enlace covalente con la metiltransferasa, lo que hace que este complejo se mande a degradación proteosomal, y así conduce a una desmetilación gradual (López et al., 2016).

La regeneración es el proceso por el cual un organismo es capaz de reestructurar o reconstituir un tejido, órgano u extremidad con la misma funcionalidad que tenía (Sánchez Alvarado y Tsonis, 2006; Özpölat y Bely, 2016). A principios del siglo XX se clasificó este proceso en dos tipos principales: la epimorfosis y la morfálaxis. El

primer tipo implica la desdiferenciación del tejido seguido de la formación de un blastema, el cual conlleva a la morfogénesis. Por otra parte, en la morfálaxis no se genera un blastema, únicamente se realiza restructuración del tejido preexistente (Morgan, 1901).

La capacidad regenerativa está ampliamente distribuida tanto en vertebrados como en invertebrados. Dentro de los invertebrados, algunas especies de anélidos poseen una extraordinaria capacidad regenerativa. Algunas de estas especies únicamente regeneran las extremidades posteriores; sin embargo, otras especies de anélidos también tienen la habilidad de regenerar partes anteriores además de las posteriores (Özpolat y Bely, 2016). Una de estas especies es *Lumbriculus variegatus*, un oligoqueto acuático que habita principalmente en lagos y estanques de América del Norte y Europa. Este organismo presenta epimorfosis de los segmentos de su cuerpo y morfálaxis neural (Drewes y Fourtner, 1990; Lesiuk y Drewes, 1999). La regeneración de los anélidos implica cinco fases principales: la cicatrización de la herida, la formación del blastema, maduración del blastema, diferenciación y crecimiento (Özpolat y Bely, 2016). La regeneración es un proceso sumamente coordinado y sincronizado que necesita una alta tasa transcripcional de genes para la formación del blastema y para continuar con la morfogénesis (Myohara et al., 2006; Özpolat y Bely, 2016; Bhambri et al., 2018).

A diferencia de los vertebrados, las metilaciones en invertebrados suelen presentarse en bajas proporciones y estas marcas están relacionadas con activación génica (Suzuki y Bird, 2008; Sarda et al., 2012); además, se ha reportado la asociación de estas marcas con modificaciones en el empalme alternativo (Terrapon et al., 2014; Arsenault et al., 2018) lo que se asocia con una posible modificación en los transcritos.

El objetivo de esta tesis fue determinar cuál es el papel de las metilaciones durante la regeneración de *Lumbriculus variegatus*. Para esto, se empleó el ácido fólico como agente metilante del ADN y se determinó el efecto del inhibidor de metiltransferasas 5-aza-2'-desoxicitidina durante 14 días consecutivos. Además, se generó una descripción del proceso de regeneración de *Lumbriculus variegatus*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Epigenética

La epigenética es el término acuñado para definir aquellas alteraciones en la expresión génica producto de modificaciones que no implican cambios en la secuencia del ADN (Moore et al., 2013; Deans y Maggert, 2015). Estos patrones se caracterizan por ser heredables, además de que pueden ser modificadas por el ambiente. Se han descrito múltiples modificaciones epigenéticas, dentro de las cuales podemos mencionar: metilaciones en el ADN, eventos de remodelación de la cromatina, ARN largos no codificantes y micro ARN. Estas marcas, además de influir en la regulación de la expresión génica, también participan en procesos como reparación, replicación y procesamiento del ARN (Crider et al., 2012). Muchas de estas marcas desempeñan un papel muy importante en procesos como la impronta génica, la supresión del cromosoma X y la expresión génica diferencial en tejidos (Moore et al., 2013).

La metilación es una de las marcas epigenéticas más estudiadas en términos de su función y localización, y se refiere a la adición covalente de un grupo metilo (-CH₃) en su mayoría en el carbono 5' de la citosina dentro de las "islas CpG", regiones de aproximadamente 200 pb con un 50% de nucleótidos C+G, aunque también puede presentarse en el nitrógeno 6' de la adenina (Lister et al., 2009; Wu et al., 2016). Se estima que existen cerca de 29 millones de dinucleótidos CpG en vertebrados y que la proporción de metilación de estos es del 70 al 80% (Lister et al., 2009). Las "islas CpG", están estrechamente relacionadas con regiones promotoras o reguladoras de genes (Gardiner-Garden y Frommer, 1987). La localización de las metilaciones varía entre diferentes grupos taxonómicos (Zemach et al., 2010).

Las enzimas responsables de la metilación son las metiltransferasas (*DNMT*). Estas se pueden clasificar en cuatro familias principales: *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* y *DNMT3L*. Las de la primera familia participan en procesos de mantenimiento; además de esta función, se ha demostrado que participa en el reconocimiento de hebras hemi-metiladas con el fin de agregar grupos metilo en la hebra

complementaria (Hermann et al., 2004). Las *DNMT3A* y la *DNMT3B*, por el contrario, son enzimas que participan en metilación *de novo* durante el desarrollo (Okano et al., 1999). La última clase son enzimas que carece del sitio catalítico que caracteriza a las anteriores, esta familia únicamente se expresa en el desarrollo temprano y está restringido a las células germinales. Se ha observado que estas favorecen la acción de las *DNMT3A* y *DNMT3B* (Suetake et al., 2004).

En vertebrados la metilación en “islas CpG” se asocia mayoritariamente con represión génica, esto porque bloquea el sitio de unión de los factores de transcripción en la región promotora. Sin embargo, se ha determinado que estas modificaciones no ejercen solo esta función, en algunas ocasiones la función está determinada por su localización dentro del genoma (Moore et al., 2013). En las regiones intergénicas se considera que las metilaciones ejercen un rol protector del genoma ya que desempeña un papel importante en la supresión de secuencias cuya expresión puede alterar la integridad o la estabilidad del genoma y de sus transcritos como lo son: secuencias retrovirales, transposones, retrotransposones, elementos transponibles (LINEs) y repeticiones en tándem (Walsh et al., 1998; Crider et al., 2012). A diferencia de las regiones anteriormente descritas, las metilaciones en la región codificante se han asociado en algunos trabajos con activación transcripcional, el mecanismo exacto de esto aún no se conoce (Lister et al., 2009; Yang et al., 2014).

Mantener un estado óptimo de las metilaciones es crucial ya que estados hipermetilados o hipometilados en algunos genes conducen al desarrollo de algunas enfermedades (Jin y Liu, 2018). Existen múltiples compuestos que pueden modificar el patrón epigenético, estos pueden encontrarse naturalmente en algunos alimentos y otros son sintetizados para suplementación o para fines terapéuticos.

2.2 Ácido fólico y su papel como agente metilante.

Existen diferentes mecanismos por los cuales un compuesto puede modular el patrón epigenético: el primero es como donador de sustratos necesarios para la adecuada metilación, por medio de la provisión de cofactores que modulan la actividad de las metiltransferasas y cambiando la actividad de las enzimas que regulan el ciclo del carbono (Zhang, 2015).

El ácido fólico (pteroilmonoglutamato) o mejor conocido como vitamina B9. Es un compuesto que participa como donador de grupos metilo para distintas reacciones metabólicas como: la síntesis de algunas proteínas, síntesis y mantenimiento de ácidos nucleicos y procesos de metilación (Crider et al., 2012). El ácido fólico se caracteriza por contener tres estructuras principales: un anillo de pteridina, ácido para-amino benzoico y uno o varios residuos de ácido glutámico (Smith et al., 2008; Brito et al., 2012). En condición natural a este compuesto se le denomina folato.

En mamíferos, el ácido fólico después de la ingesta es metabolizado a dihidrofolato (DHF), posteriormente reducido a la forma activa tetrahydrofolato (THF). Este compuesto es transformado a 5,10metil-tetrahydrofolato precursor del compuesto 5-metil tetrahydrofolato, un donador de grupos metil para la conversión de homocisteína a metionina por medio de la enzima metionina-sintasa (MS). Por su parte, este compuesto es sustrato para la formación del cofactor de las metiltransferas, S-adenosil metionina (SAM) (Crider et al., 2012).

Los compuestos reducidos del ácido fólico presentan características hidrofílicas, por lo que su inserción al entorno celular depende de transportadores. Estos pueden ser introducidos a la célula por medio de tres tipos de transportadores: el primero es por medio de transportadores de folato acoplados a protones (PCFT), por medio de intercambiadores aniónicos (Rfc1 y Rfc2) o por medio de receptores de folato For1 (α , β , λ) (Iskandar et al., 2010; Zhao et al., 2011).

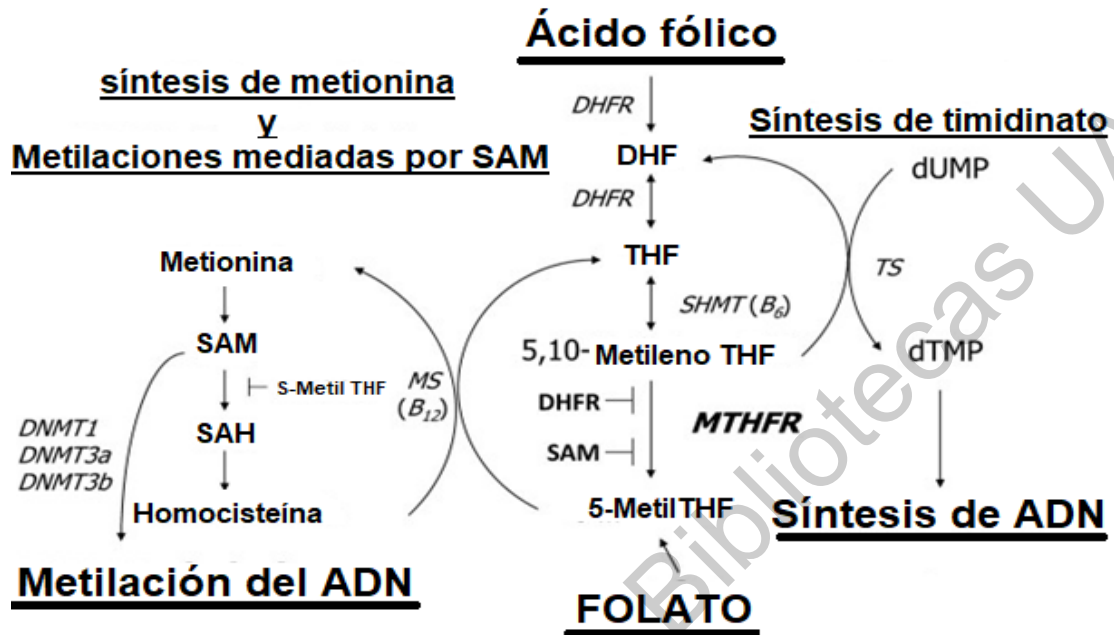


Figura 1. Metabolismo del Ácido Fólico. Esquema ilustra el metabolismo del ácido fólico. DHF (dihidrofolato), DNMT (metiltransferasas), DHFR (dihidrofolato reductasa), MS (metionina sintasa), SAH (s-adenosilhomocisteína), SAM (s-adenosilmetionina), SHMT (serina hidroximetiltransferasa) THF (tetrahydrofolato), dTMP (timidilato), dUMP (monofosfato de desoxiuridina), TS (timidilato sintasa). Imagen tomada y modificada de (Crider et al.,2012)

2.3 Inhibidores de metilación

Los inhibidores de las metiltransferasas suelen clasificarse en dos grandes grupos: análogos de nucleósidos y los no-análogos (Gros et al., 2012; López et al., 2016). Muchos de estos fármacos actualmente están aprobados por la FDA y son empleados en algunas patologías como la leucemia y algunos otros tipos de cáncer (FDA, 2019).

Dentro de los análogos de nucleósidos encontramos a los inhibidores de primera generación. Los primeros en sintetizarse fueron la Azacitidina (5'azacytidine) y la Decitabina (5-aza-2'-deoxycytidine) en 1964, empleados como tratamiento de la leucemia mieloide (Sorm et al., 1964). Hasta 1980 se describió que estos fármacos generaban cambios en la diferenciación en células embrionarias de ratón y participaban en la inhibición de metilaciones en el ADN recién sintetizado (Taylor y Jones, 1979; Jones y Taylor, 1980). Estos fármacos se caracterizan porque en la posición 5' de la citidina poseen un átomo de nitrógeno, a diferencia de la citidina que en condiciones normales presenta un átomo de carbono. Estos a su vez están unidos a una ribosa para el caso de la azacitidina y a una desoxirribosa para la decitabina.

La farmacodinámica de estos compuestos implica una serie de eventos: después de la ingesta, estos fármacos son introducidos a la célula por transportadores de nucleósidos (hCNT1), posteriormente fosforilados para la conversión a su forma activa (Agrawal et al., 2018). La decitabina es incorporada directamente en el ADN debido a sus propiedades como desoxirribosa. Por el contrario, la azacitidina se estima que de un 10 al 20% se incorpora al ADN al transformarse en su complementario, el porcentaje restante es incorporado al ARN, esto genera que este fármaco presente un mayor efecto citotóxico a diferencia de su complementario porque altera el metabolismo del ARN y la síntesis de proteínas (López et al., 2016; Zahnow et al., 2016). Después de que el fármaco es incorporado en la secuencia del ADN, esta molécula es reconocida por las metiltransferasas generando un enlace covalente irreversible con el complejo, esto producto de la modificación en

el carbono 5' de los inhibidores. Posteriormente, el complejo es llevado a degradación proteasomal. La degradación de la enzima genera inhibición gradual de la metilación. Para la incorporación selectiva y efectiva de estos fármacos es necesario que la célula se encuentre en fase S del ciclo celular con el fin de que estos fármacos puedan ser incorporados en el ADN recién sintetizado (Yang et al., 2010).

Estos fármacos son excelentes agentes terapéuticos para algunos tipos de cáncer. Las dosis empleadas para el tratamiento de enfermedades suelen administrarse en concentraciones bajas para tener un efecto en la inhibición de la metilación ya que en concentraciones altas se produce citotoxicidad porque interviene en la síntesis del ARN (Agrawal et al., 2018).

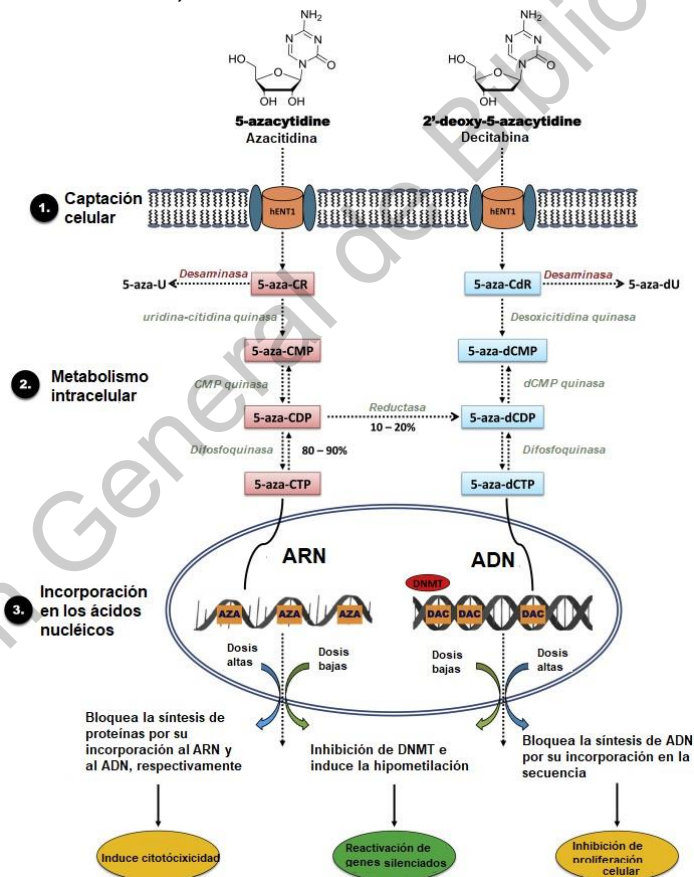


Figura 2. Mecanismo de acción de los fármacos análogos a nucleósidos. La imagen muestra el mecanismo de acción de los fármacos análogos a nucleósidos. Los fármacos son transportados a la célula por el transportador de nucleósido (hENT1). Estos fármacos son transformados por acción de varias quinazas en su forma activa 5-aza-2'-citidina-trifosfato (5-aza-CTP) y 2'-desoxi-5-azacitidina-trifosfato (5-aza-dCTP). Posteriormente, son incorporados al ADN o al ARN, respectivamente. Imagen tomada y modificada de (Agrawal et al., 2018)

2.4 REGENERACIÓN

La regeneración es un proceso fascinante dentro de la biología debido a que es un altamente dinámico y sincronizado. Sin embargo, esta habilidad se ha restringido solo a algunas especies. Algunas de las preguntas que sobresalen en estos organismos son: ¿cómo se regula este proceso?, ¿cómo se pierde o se gana este mecanismo? Esta habilidad ha sido tema de investigación durante muchos años. Con el desarrollo de la microscopía y de la biología molecular se ha podido ampliar el conocimiento de este proceso; sin embargo, muchos detalles del proceso aún siguen sin ser explorados (Elliott y Sánchez Alvarado, 2013).

La regeneración puede definirse como el proceso por el cual un organismo es capaz de reestructurar o reconstituir tejido, órgano o extremidad con la misma funcionalidad que la anterior (Sánchez Alvarado y Tsonis, 2006; Özpölat y Bely, 2016). A principios del siglo XX, Morgan fue el primero en clasificar este proceso en dos tipos principales: epimorfosis y morfalaxis. Posteriormente se incorporó un tercer tipo, el cual se denomina intermedio o regeneración compensatoria, el cual involucra ambos mecanismos (Gilbert, 2000).

La morfalaxis es un tipo de regeneración que implica la reestructuración del tejido preexistente con el fin de generar la estructura perdida. Este tipo de regeneración no implica la formación de un blastema (término que se le asigna al cúmulo de células desdiferenciadas con capacidades totipotenciales), ni la proliferación celular (Morgan, 1901). Por el contrario la epimorfosis es el tipo de regeneración que implica la formación de un blastema. Este tipo de regeneración consta de una serie de eventos coordinados: después de la herida, la zona afectada se contrae con el fin de parar el sangrado y evitar infecciones. Posteriormente, se describe la formación de la capa epidérmica apical, la cual junto con los nervios periféricos está implicada en iniciar la formación del blastema. El siguiente paso consta de la migración celular al sitio de la herida, muchas de estas células están involucradas en la desdiferenciación del tejido. (Reddien y Alvarado, 2004; Sánchez Alvarado y Tsonis, 2006).

2.5 ANÉLIDOS

Dentro de los invertebrados se encuentra el phylum Annelida, que agrupa organismos diversos en morfología, los cuales están localizados en múltiples ambientes. Se estima que el phylum contiene cerca de 18,000 especies (Özpolat y Bely, 2016). Su distribución cosmopolita puede deberse a su gran plasticidad evolutiva, ya que muchos de estos han desarrollado mecanismos de osmoregulación y presentan gran diversidad de estrategias reproductivas (Fauchald Kristian, 1977).

Los anélidos suelen encontrarse principalmente en sedimentos con una proporción considerable de agua. Podemos encontrar especies que habitan en ambientes marinos de poca profundidad hasta especies que suelen vivir a considerables profundidades oceánicas. Dentro de este filo, también encontramos especies que habitan ambientes terrestres. La alimentación de los anélidos varía en las diferentes especies; encontramos detritívoros, omnívoros, carnívoros y parásitos (Özpolat y Bely, 2016).

La característica general de este grupo es que son organismos metaméricos, esto se refiere a que presentan un cuerpo segmentado longitudinalmente. Según la forma de estos metámeros puede clasificarse en homoméricos o heteroméricos. La cavidad central del cuerpo de los anélidos se le denomina celoma, a lo largo de este se encuentran el sistema digestivo, el sistema sensorial y sistema locomotor. El cuerpo de los anélidos puede dividirse en tres regiones principales: el prostomio, tronco segmental y pignidio. Dentro de la primera región se encuentran localizado el peristomio, peridio y los ganglios cerebrales (cerebro); esta región en algunos anélidos suele ser pre-segmentaria. En ciertas especies, principalmente en las excavadoras, suelen presentarse estructuras sensoriales como los palpos, antenas y cirros. En la segunda región encontramos el cuerpo que consta de la región segmentaria, cada metámero se encuentra separado por esfínteres musculares los cuales desempeñan un papel importante en la locomoción. En esta región también se pueden encontrar algunos apéndices accesorios implicados en el movimiento,

como lo son: podios, parapodios o fasículos. La última región se localiza en la sección terminal del anélido, en esta se encuentra el órgano excretor (Fauchald Kristian, 1977; Bleidorn et al., 2015). La importancia ecológica de este filo es que son organismos degradadores de suelo, además sirven de alimento para múltiples organismos en la cadena trófica. Por otra parte, estos organismos son empleados en estudios toxicológicos (Dean, 2008). Dentro de este grupo encontramos al modelo de estudio empleado en esta tesis, *Lumbriculus variegatus*.

2.6 Modelo de estudio, *Lumbriculus variegatus*.

Lumbriculus variegatus es un oligoqueto acuático que pertenece a la familia Lumbriculidae, este se distribuye principalmente en Europa y América del Norte. Son gusanos hermafroditas que presentan un cuerpo segmentado con alrededor de 100 a 150 metámeros idénticos. Los adultos pueden alcanzar una longitud de 5 a 10 cm y un diámetro de 1.5 mm (Drewes y Brinkhurst, 1990). Esta especie habita primordialmente en lagos, estanques, pantanos de márgenes poco profundos (Brinkhurst y Gelder, 1991).

Su sistema nervioso consiste en tres estructuras principales: el ganglio cerebral, cordón nervioso ventral y los nervios segmentales. El ganglio cerebral está localizado en el primer segmento del protostomio. El cordón nervioso ventral se extiende a lo largo de todo el cuerpo y se caracteriza por presentar tanto neuronas sensoriales como motoras; en este se encuentran tres fibras nerviosas gigantes: una medial y dos laterales. La fibra medial, responde a estímulos producidos en la zona anterior del cuerpo y las laterales están implicados en la respuesta a estímulos de las regiones posteriores. Por último, los nervios segmentales se derivan del cordón nervioso ventral desde el tercer segmento anterior e inervan cada segmento del cuerpo (Drewes y Fournier, 1990; Drewes, 2002).

El sistema circulatorio de esta especie se caracteriza por presentar dos vasos principales: uno dorsal y uno ventral, por los cuales la sangre fluye en dirección anterior en el vaso dorsal y en dirección posterior en el vaso ventral. Los grandes

vasos se bifurcan en vasos laterales a lo largo de cada segmento (Ryan y Elwess, 2017).

Lumbriculus variegatus presenta dos tipos de reproducción. La primera, es sexual por medio de la generación de capullos transparentes, los cuales pueden contener de uno a ocho huevos recién fertilizados. La eclosión de estos se da posterior a las dos semanas de maduración (Drewes y Brinkhurst, 1990). Sin embargo, este tipo de reproducción se limita únicamente a organismos de vida libre. En condiciones de laboratorio se ha reportado primordialmente reproducción asexual. Este tipo de reproducción, implica la fragmentación de las regiones de su cuerpo seguido por la regeneración de la extremidad perdida (Lesiuk y Drewes, 1999). Este proceso puede ocurrir en fragmentos con un mínimo de ocho segmentos (Drewes y Fourtner, 1990; Martínez et al., 2005). *L. variegatus* es una de las especies dentro del filo de los anélidos que posee la capacidad de regenerar parte anterior y posterior de su cuerpo (Özpolat y Bely, 2016). Otra característica importante de este organismo es que presenta dos tipos de regeneración epimorfosis de las regiones del cuerpo y morfalaxis neural. (Drewes y Fourtner, 1990; Drewes y Fourtner, 1991; Martínez et al., 2008). Lo que hace a esta especie un excelente modelo para estudios de regeneración.



Figura 3. Modelo de estudio, *Lumbriculus variegatus*. La imagen de la izquierda muestra un adulto sin indicios de regeneración en ambas extremidades. La imagen de la derecha muestra la región anterior de *Lumbriculus variegatus* posterior a la regeneración.

2.7 REGENERACIÓN EN INVERTEBRADOS Y EL PAPEL DE LA METILACION

Dentro de los anélidos encontramos algunas especies con una extraordinaria capacidad regenerativa. Algunas especies se han limitado únicamente a regenerar partes posteriores del cuerpo; sin embargo, encontramos algunas que presentan regeneración anterior y posterior (Özpolat y Bely, 2016). Los anélidos son excelentes organismos para estudios de regeneración, ya que son organismos fáciles de mantener en el laboratorio y, sobre todo, porque presentan dos tipos de regeneración.

El primer evento en la regeneración de anélidos es la contracción muscular cuya finalidad es detener la hemorragia y evitar posibles infecciones. Algunas especies son capaces de generar autólisis en el sitio de la lesión. Posterior a este primer evento, se ha reportado migración celular hacia el sitio de la herida, este evento es clave en la regeneración de los anélidos ya que se ha asociado que estas células pueden participar en eventos de cicatrización, fagocitar desechos celulares generados y participar en sistema de defensa (Cornec et al., 1987; Bely, 2014); además, se asocia con la migración de neoblastos, término acuñado a células totipotenciales en anélidos implicadas en la regeneración (Randolph, 1892). Se cree que el segundo evento es la fusión del epitelio con el fin de cicatrizar la herida y dar pauta a la generación de la capa epidérmica, la cual es uno de los principales potenciadores junto a las señales otorgadas por el sistema nervioso para la generación del blastema (Bely, 2014). El tiempo de generación del blastema varía entre especies, pero suele ser visible entre el primer día post-amputación y el cuarto día (Özpolat y Bely, 2016). Posterior a este periodo, el blastema tiene que generar polaridad para determinar qué región del cuerpo va generar. Durante la maduración del blastema los nervios provenientes del cordón nervioso ventral penetran a este sitio y generan un bucle único o un bucle tripartito nervioso dependiendo de la especie, esto da pauta a la formación del sistema nervioso de los anélidos (Özpolat y Bely, 2016).

Posteriormente los elementos neuronales se desarrollan específicamente en cada extremidad. En conjunto se lleva a cabo la formación de los otros sistemas. El sistema muscular se comienza a desarrollar poco después de que el blastema es visible, aquí se lleva a cabo la formación de fibras musculares circulares o transversas y también se regeneran las fibras longitudinales. Entre el día 2 al 8 se lleva a cabo la segmentación y la diferenciación entre extremidades (Özpolat y Bely, 2016). El tiempo de regeneración varía entre especies (Özpolat y Bely, 2016).

Durante el proceso de regeneración se ha descrito un alto nivel transcripcional desde la formación del blastema con el fin de poder llevar a cabo la morfogénesis de la región perdida de su cuerpo (Özpolat y Bely, 2016). Algunos de los genes implicados en la formación del blastema son los relacionados con la multipotencia y genes de la línea germinal, Hox, Wnt, FGF, genes reguladores de la transición de epitelio-mesénquima (SOX) y algunos genes implicados en la regeneración del sistema nervioso (Nf70 y tRk1) (Myohara et al., 2006; Kozin y Kostyuchenko, 2015; Bhambri et al., 2018), por mencionar algunos de estos.

Como se ha descrito previamente, en vertebrados, las metilaciones desempeñan un papel fundamental en la expresión génica durante diferentes procesos. Sin embargo, recientemente ha surgido el interés por explorar y comparar las funciones que estas marcas desempeñan dentro de los diferentes grupos taxonómicos. Retomando secciones anteriores, las metilaciones en los vertebrados se presentan en gran proporción en regiones intergénicas y en regiones repetitivas del genoma. A diferencia, el genoma de los invertebrados se caracteriza por presentar bajos niveles de metilación y se asocian principalmente a las regiones codificantes de los genes (Suzuki y Bird, 2008; Zemach et al., 2010; Sarda et al., 2012). Gran parte de la información sobre metilaciones en invertebrados se ha realizado en insectos sociales (abejas , avispas , hormigas y termitas) donde se han relacionado con la plasticidad conductual y el comportamiento social (Yan et al., 2015). Se ha observado que genes de alta y mediana expresión, así como genes constitutivos suelen presentar una alta tasa de metilación lo que indica la relación de las metilaciones con la activación transcripcional, además de que genes que exhiben

una cantidad mayor de metilación están conservados en algunas especies de invertebrados (Sarda et al., 2012). Además de esto, se ha determinado que estas marcas desempeñan un papel importante en el empalme alternativo (Terrapon et al., 2014; Arsenault et al., 2018). Esto es muy interesante ya que este evento podría ser más complejo que en otros organismos, ya que la hipótesis es que la metilación en la región promotora podría influir con distintos factores durante este evento y así poder excluir genes o incluir exones al momento de la transcripción (Yan et al., 2015).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

3. HIPÓTESIS

Con base en la función que desempeñan las metilaciones en el ADN en invertebrados, las metilaciones en el ADN modulan la regeneración de *Lumbriculus variegatus*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las metilaciones en el ADN en la regeneración anterior y posterior del oligoqueto acuático *Lumbriculus variegatus*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la regeneración anterior y posterior de *Lumbriculus variegatus* durante 14 días consecutivos.
- Evaluar el efecto del ácido fólico, como agente metilante, en la regeneración anterior y posterior de *Lumbriculus variegatus*.
- Determinar el efecto de la 5-aza-2'-desoxicitidina, como agente inhibidor de la metilación, en la regeneración anterior y posterior del oligoqueto *Lumbriculus variegatus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Declaración bioética

Los experimentos que se realizaron en este trabajo fueron aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Número de registro: 120FCN2018.

5.2 Obtención de la especie

Los organismos empleados en los experimentos de este trabajo fueron adquiridos de la empresa Aquarem (<http://www.aquarem.com.mx>). Las instalaciones de la empresa se encuentran ubicadas en el estado de México.

5.3 Mantenimiento y estabilización de las peceras.

Los organismos se colocaron en peceras de plástico con las siguientes dimensiones: 23.2 cm x 15.24 cm x 16.8 cm. Estas poseen ventilación en la parte superior. Todas las peceras fueron almacenadas a 4°C las 24 horas del día. El mantenimiento de los organismos se realizó dos veces por semana. Durante este proceso se coloca a los oligoquetos en un recipiente circular de 35mm de diámetro con aproximadamente 300 ml de agua. El lavado de las peceras se realizó únicamente con agua purificada. Posterior a este paso, se agregaban aproximadamente 500 ml de agua purificada y se incorporaban nuevamente las lombrices a la pecera. Las especies fueron alimentadas con espirulina comercial, dos veces por semana.

5.4 Criterios de inclusión

Para todos los experimentos se seleccionaron oligoquetos adultos, los cuales no presentaron indicios de fisión o daños en ninguna de las extremidades. Se incluyeron únicamente aquellos individuos que presentaban una pigmentación marrón uniforme (indicador de ausencia de regeneración). Se excluyeron de los experimentos aquellos oligoquetos que presentaron indicios de fisión durante el experimento.



Figura 4. Indicios de fisión en *Lumbriculus variegatus*.

5.5 Generación de cámaras para visualización de regeneración

Se fabricaron cámaras de visualización para montar los oligoquetos en el microscopio óptico (Figura 4). En un portaobjetos se colocaron ocho capas de parafilm, posterior a esto se hizo una ranura longitudinal de aproximadamente 4 cm con un grosor de 0.5 cm (Ryan y Elwess, 2017).



Figura 5. Cámara para visualización de la extremidad anterior.

5.6 Efecto del ácido fólico en la regeneración de *Lumbriculus variegatus*

5.6.1 Prueba toxicológica de NaOH

Para la determinación toxicológica se emplearon oligoquetos adultos a los cuales se les administró 10 ml de 0.1 M, 0.01 M, 0.001 M de NaOH respectivamente (n=10 para cada grupo). En el control se administró únicamente agua purificada. Las placas se mantuvieron durante 2 días a $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Se determinó el índice de toxicidad después del tratamiento y posterior a las 24 horas. Se evaluaron los siguientes criterios:

1. Daño: para determinar que la exposición con el disolvente no alterará la integridad de los oligoquetos o que generará lesiones que pudieran interferir en la regeneración.
2. Indicios de fisión: para determinar que el disolvente no promoviera la fisión en días posteriores.
3. Movimiento: para determinar que el disolvente no causara daños en el sistema nervioso de los oligoquetos.
4. Pigmentación: para determinar que el tejido no estaba desdiferenciado.
5. Agrupación: comportamiento normal en esta especie.

5.6.2 Administración de 0.05 mg/ml de ácido fólico y 0.001 M de NaOH en oligoquetos regenerando

Se seleccionaron oligoquetos adultos, estos se mantuvieron una semana previa al inicio del experimento en inanición y a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante las 24 horas del día (Tweeten y Anderson, 2008). Posterior a este periodo, se realizaron cortes mediales en cada uno de los oligoquetos; para esto se empleó la siguiente metodología: se insertó un disco de papel filtro en una caja Petri de 90 x 15 mm y se incorporaron unas gotas de agua purificada hasta humedecer toda la superficie. Posteriormente, se colocó a cada oligoqueto y se realizó la amputación. La región anterior y posterior del cuerpo se colectó y se almacenaron en cajas Petri de 35 mm (Drewes, 1996).

Al grupo control, se le administraron 3 ml de 0.001 M de NaOH tanto en la parte anterior así como en la posterior. Al grupo experimental se le administraron 3 ml de solución 0.001 M de NaOH que contenía 0.05 mg/ml de ácido fólico. Las placas se almacenaron a 20°C durante todo el experimento. El número de individuos para cada grupo fue de 20.

La tasa de regeneración se determinó del día 3 al 7 y del 10 al 14. Durante la medición se colocó al oligoqueto en una caja de Petri sin medio y se le añadieron unas gotas de etanol al 2.5% para disminuir el movimiento. Posterior al registro, se administró nuevamente la solución tanto para el control como para el tratamiento y se almacenaron en las mismas condiciones ya descritas.

5.6.3 Administración de 0.1 mg/ml de ácido fólico y 0.0001 M de NaOH en oligoquetos regenerando

Se seleccionaron oligoquetos adultos los cuales se mantuvieron un día previo al inicio del experimento en inanición y temperatura de 20°C± 2. Posterior a este periodo, se realizaron cortes mediales en cada uno de los oligoquetos; para esto se empleó la metodología descrita en el apartado de ácido fólico (5. 6. 2.)

Al grupo control, se le administraron 3 ml de 0.0001 M de NaOH tanto en la parte anterior como en la región posterior. Al grupo experimental se le administraron 3 ml de solución de 0.0001 M de NaOH que contenía 0.1 mg/ml de ácido fólico (administración tópica). Las placas se almacenaron a 20°C± 2 durante todo el experimento. El número de individuos para cada grupo fue de 15.

La tasa de regeneración se determinó durante 14 días consecutivos. Durante la medición se colocó al oligoqueto en una caja de Petri sin medio y se le añadían unas gotas de etanol al 2.5% para disminuir el movimiento. Posterior al registro, se administró nuevamente la solución tanto para el control como para el tratamiento y se almacenaron en las mismas condiciones ya descritas.

5.7 Efecto de la 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior y posterior del *Lumbriculus variegatus*.

5.7.1 Prueba toxicológica del DMSO

Para la determinación toxicológica se emplearon oligoquetos adultos a los cuales se les administraron 10ml de 0.1%, 0.01%, 0.001% de DMSO respectivamente, (n=10 para cada grupo). Al control se administró únicamente agua purificada. Las placas se mantuvieron durante dos días a 20°C ± 2. Se determinó el índice de toxicidad después del tratamiento y posterior a las 24 horas del tratamiento. Se evaluaron los siguientes criterios: daño, indicios de fisión, movimiento, pigmentación y agrupación.

5.7.2 Efecto de 30 µM de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de *Lumbriculus variegatus*

Se seleccionaron oligoquetos adultos y se mantuvieron un día en inanición. Posterior a este periodo, se realizaron cortes mediales en cada uno de los oligoquetos con la metodología descrita en la sección de ácido fólico (5. 6. 2). Se recuperaron ambas extremidades y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml. Al grupo control se le administró 0.5 ml de 0.013% de DMSO. Al segundo grupo se le incorporó 0.5ml de una solución que contenía 0.013% de DMSO y 30 µM de 5-aza-2'-desoxicitidina 24 horas previas a la amputación. Posterior a este periodo se retiró la solución y únicamente se le incorporó DMSO a la misma concentración que el control durante los días siguientes del experimento. Al tercer grupo se le administró la solución de 30 µM de 5-aza-2'-desoxicitidina durante 14 días consecutivos. n=7 para cada grupo (administración tópica).

La tasa de regeneración se determinó del día 1 al 2, del 5 al 9 y del 12 al 14. Durante la medición se colocó al oligoqueto en una caja de Petri sin medio y se le añadieron unas gotas de etanol al 2.5% para disminuir el movimiento. Posterior al registro, se administró nuevamente la solución tanto para el control como para el tratamiento y se almacenaron en las mismas condiciones ya descritas.

5.7.3 Efecto de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de *Lumbriculus variegatus*.

Se seleccionaron oligoquetos adultos y se mantuvieron un día en inanición. Posterior a este periodo, se realizaron cortes mediales en cada uno de los oligoquetos con la metodología descrita en la sección de ácido fólico (5. 6. 2). Se recuperaron ambas extremidades y se colocaron en tubos Falcón de 15 ml. Al grupo control se le administró 0.5 ml de 0.045% de DMSO. Al segundo grupo se le incorporó una solución que contenía 0.045% de DMSO y 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina durante 24 horas, posterior a este periodo únicamente se le incorporo DMSO a la misma concentración que el control. Al tercer grupo se le administró la solución de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina durante 14 días consecutivos. n=5 para cada grupo (administración tópica).

La tasa de regeneración se determinó durante 14 días consecutivos. Durante la medición se colocó al oligoqueto en una caja de Petri sin medio y se le añadían unas gotas de etanol al 2.5% para disminuir el movimiento. Posterior al registro, se administró nuevamente la solución tanto para el control como para el tratamiento y se almacenaron en las mismas condiciones ya descritas. Posteriormente se replicó este experimento determinando el tamaño mínimo de muestra a partir de este bioensayo (n=10).

5.8 Análisis estadístico

5.8.1 Pruebas toxicológicas

Para la determinación de la toxicidad de los reactivos administrados en los experimentos se evaluaron los siguientes criterios: pigmentación, movimiento, agrupación y daño.

5.8.2 Análisis de imágenes obtenidas en los ensayos

Los videos obtenidos de los bioensayos con ácido fólico y del 5-aza-2'-desoxicitidina se analizaron con el programa Adobe Premier Pro (<https://www.adobe.com/mx/products/premiere.html>). Se extrajo el fotograma de cada video y se seleccionaron aquellas imágenes donde el oligoqueto no se encontraba ni elongado ni contraído en la región regenerada. Posteriormente, se

determinaron los milímetros de regeneración del blastema o parte regenerada con el programa Image J (Schneider, 2012).

5.8.3 Análisis estadístico

Para cada experimento, se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas (RM-ANOVA) para determinar diferencias totales de regeneración. Como los datos no presentaban homogeneidad de varianzas se tomó en cuenta los resultados de la prueba Greenhouse-geisser. Posteriormente se realizó una prueba *post-hoc* de Bonferroni para determinar la diferencia entre grupos. Respecto a los análisis estadísticos entre días. Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos y la prueba de Bartlett para determinar la homogeneidad de varianzas. Como no se obtuvo distribución normal, se determinó la significancia estadística con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Para los días que presentaron heterogeneidad de varianzas se empleó la prueba *post-hoc* de Welch. Los RM-ANOVAS se realizaron con el programa SPSS (versión prueba). La comparación entre días y las gráficas se realizaron con el programa R-studio (versión 1.1.463) (<https://www.rstudio.com>).

6. RESULTADOS

6.1 Descripción del proceso de regeneración de *Lumbriculus variegatus*

El proceso de regeneración en anélidos consta de cinco fases principales: (1) cicatrización, (2) generación del blastema, (3) maduración del blastema, (4) diferenciación y (5) crecimiento (Özpolat y Bely, 2016). La tabla 1 y 2 muestran las fases de regeneración en *Lumbriculus variegatus*. La cicatrización se observó durante las primeras 12 horas post-amputación (hpa). El blastema se logró identificar entre ~12 hpa, aunque este evento era variable entre individuos. La maduración del blastema se determinó dentro de los primeros 2 dpa (días post-amputación). La diferenciación se observó desde el 3 dpa hasta el 7 dpa. El crecimiento continuó del día 7 dpa hasta días posteriores.

Regeneración anterior		
Etapa	Intervalo de tiempo	Evento
1	post-amputación	Contracción muscular Formación de la capa epidérmica apical
2	~12hpa	Generación de blastema
3	1 dpa 2 dpa	Aumento de tamaño del blastema
4	3 dpa 4 dpa 5 dpa 6 dpa 7 dpa	Formación del peristomio Diferenciación Formación de vasos sanguíneos Segmentación
5	8 dpa 9 dpa 10 dpa 11 dpa 12 dpa 13 dpa 14 dpa	Aumento de tamaño de los segmentos



Tabla 1. Regeneración de la extremidad anterior. La tabla muestra los eventos en la regeneración de la extremidad anterior durante 14 días. hpa (horas post-amputación), dpa (días post-amputación).

Regeneración posterior		
<i>Etapa</i>	<i>Intervalo de tiempo</i>	<i>Evento</i>
1	post-amputación	Contracción muscular Formación de la capa epidérmica apical
2	~12hpa	Generación de blastema
3	1 dpa	Aumento de tamaño del blastema
4	2 dpa	Diferenciación (Formación del peridio y ano)
	3 dpa	Formación de vasos sanguíneos Inicia la segmentación
5	4 dpa	Formación de vasos sanguíneos Incorporación de segmentos Aumento de tamaño de los segmentos
	5 dpa	
	6 dpa	
	7 dpa	
	8 dpa	
	9 dpa	
	10 dpa	
	11 dpa	
12 dpa		
13 dpa		
14 dpa		



Tabla 2. Regeneración de la extremidad posterior. La tabla muestra los eventos de la regeneración posterior durante 14 días. hpa (horas post-amputación), dpa (días post-amputación)

Con base en los resultados se infiere que posterior a la amputación los oligoquetos sufren hemorragia por el traumatismo generado. En esta etapa se observa la pérdida de células pigmentarias en ambas extremidades. Durante los primeros minutos se detiene el sangrado producto de la contracción muscular de los segmentos proximales. No se lograron observar cambios significativos durante las siguientes horas. Entre la hora 12 se empieza a formar el blastema, este incrementa de tamaño con el tiempo (Figura 6 y 7). Durante el primer día de regeneración se puede apreciar el blastema y la capa epidérmica apical formada (Figura 6 y 7), en algunos individuos se observó una mayor proporción en el blastema de la región anterior que en la posterior durante la hora 24. Un aspecto importante por mencionar, es que los individuos siempre mantuvieron el movimiento. En el segundo día, se observó el aumento de tamaño del blastema y comenzó a observarse cambios morfológicos entre extremidades solo en algunos individuos, esto se hace más notable en el 3 dpa. A diferencia de los días anteriores, durante el tercer día se presentó diferencia morfológica entre ambas regiones, la parte anterior se caracteriza por presentar una estructura de forma esférica y la posterior adquirió una forma triangular. Durante este día se observa la presencia de vasos sanguíneos y se puede apreciar el movimiento sanguíneo dentro de estos (Figura 8). Durante el día 4, se determinó la presencia de los vasos ventrales y los vasos dorsales, de igual manera se lleva a cabo la formación de vasos laterales y los capilares en ambas extremidades. Del día 3 al 7 se puede distinguir que los vasos adquieren una mayor proporción y que el grado de inervación en cada segmento aumenta con el tiempo. Para la región posterior se observa como los vasos aumentan de tamaño en las regiones más proximales a la zona donde se generó la amputación y en la zona de crecimiento estos vasos suelen ser más pequeños (Figura 8).

Respecto al sistema digestivo de *Lumbriculus variegatus* durante el segundo día se logró apreciar el ano, este no incrementa de tamaño con el tiempo (Figura 10). Por otra parte, en la región anterior al día 3 se empieza a distinguir una pequeña invaginación en el tejido. Durante el día 4 y el día 5 esta hendidura se hace más prominente y forma el peristomio, conforme el tiempo transcurrido esta se vuelve más profunda. El peristomio termina de formarse aproximadamente durante el día

5. Un aspecto importante por mencionar es que el desarrollo de esta región varía entre individuos (Figura 9).

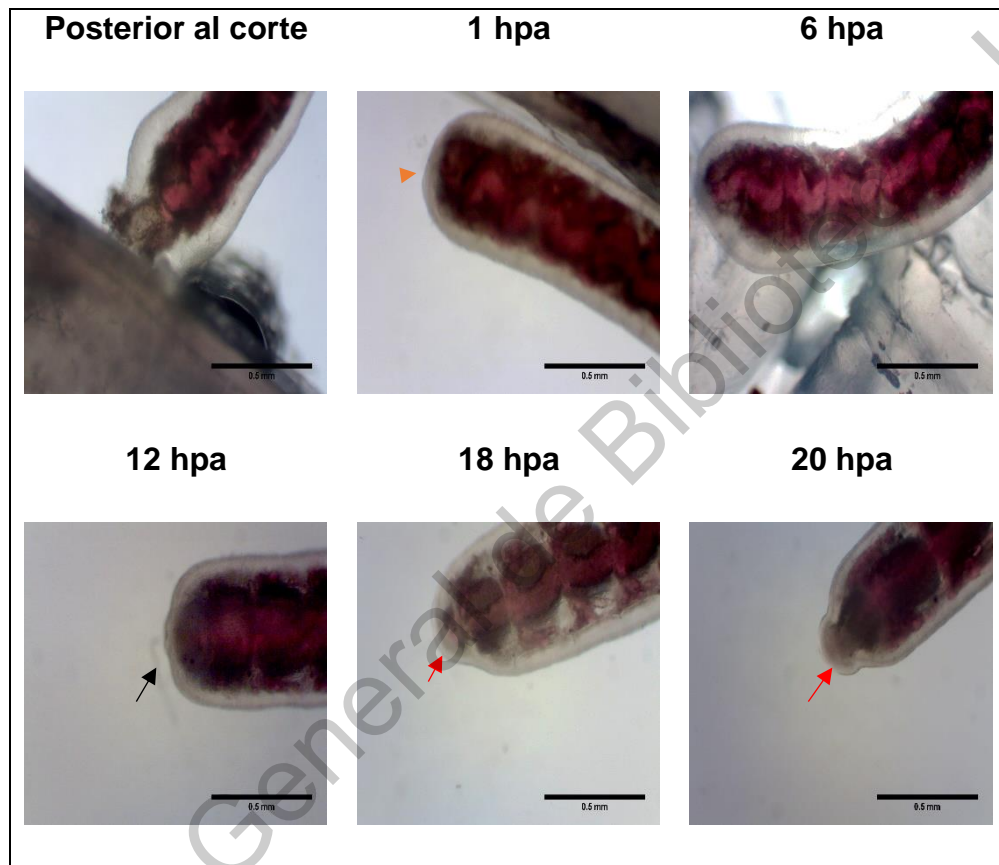


Figura 6. Regeneración anterior de *Lumbriculus variegatus* durante las primeras 20 horas. La imagen muestra la regeneración anterior durante las primeras horas post-amputación. hpa (horas post-amputación), escala 0.5 mm. Flecha naranja: contracción muscular, flecha negra: capa epidérmica apical, flecha roja: blastema.

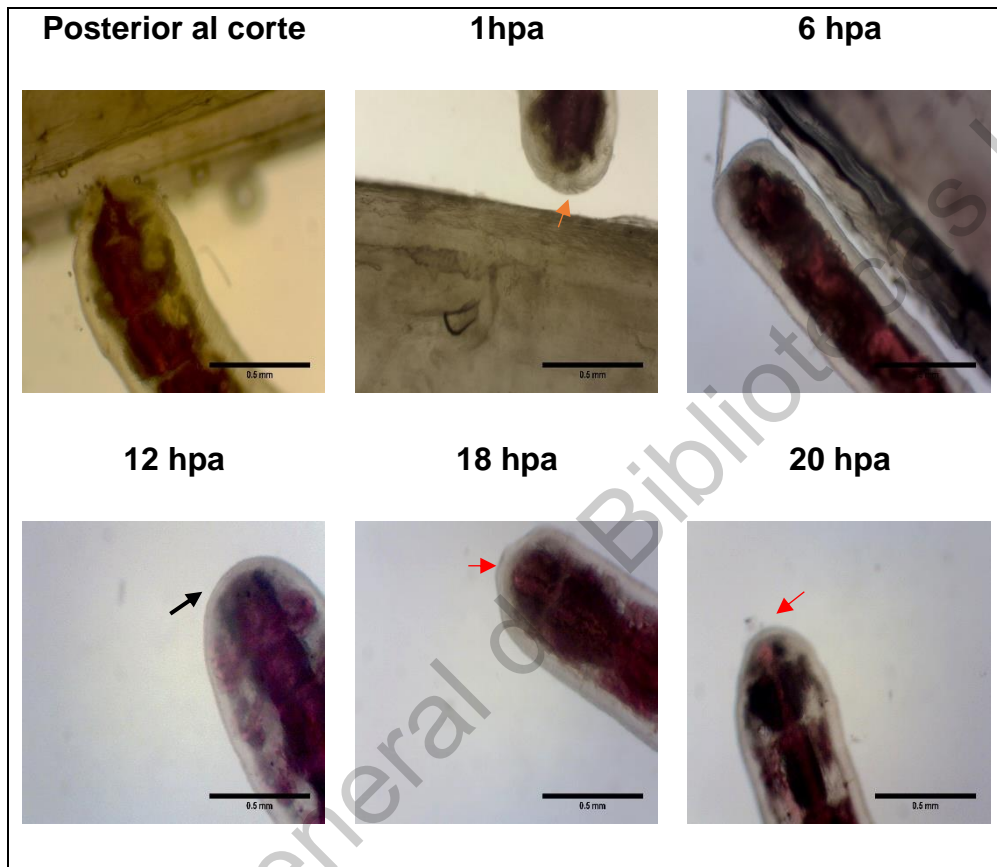


Figura 7. Regeneración posterior de *Lumbriculus variegatus*, durante las primeras 20 horas. La imagen muestra la regeneración posterior durante las primeras horas post-amputación. Las flechas negras indican el blastema y la flecha azul indica la contracción muscular. hpa (horas post-amputación), escala 0.5 mm. Flecha naranja: contracción muscular, flecha negra: capa epidérmica apical, flecha roja: blastema.

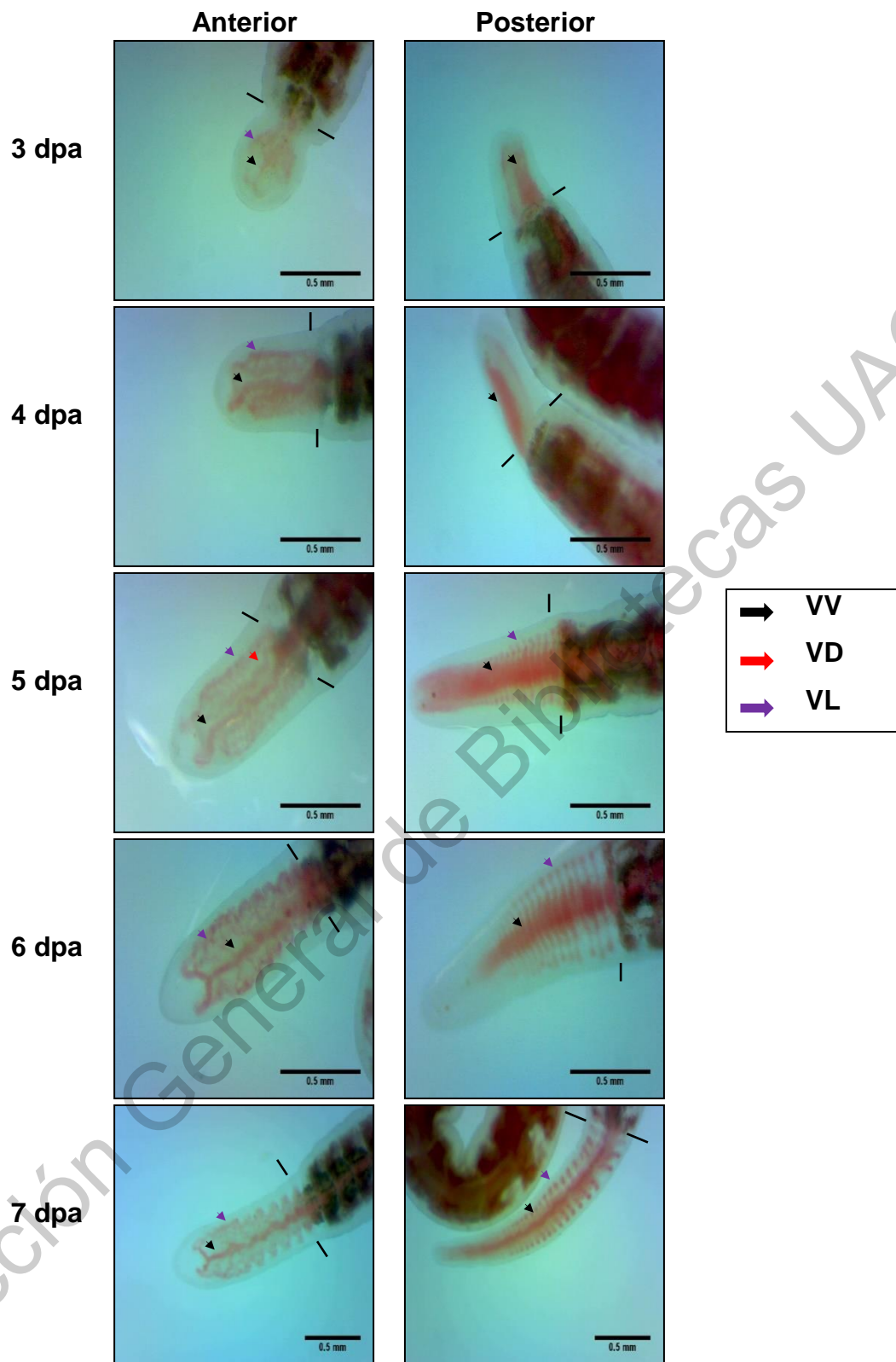


Figura 8. Regeneración del sistema circulatorio en *Lumbricus variegatus*. Se observa la regeneración anterior y posterior del sistema circulatorio desde el tercer día posterior al corte hasta el día 7. dpa (días post-amputación), VD (vaso dorsal), VV(vaso ventral), vasos laterales(VL) y región de corte(líneas negra). Escala=0.5mm.

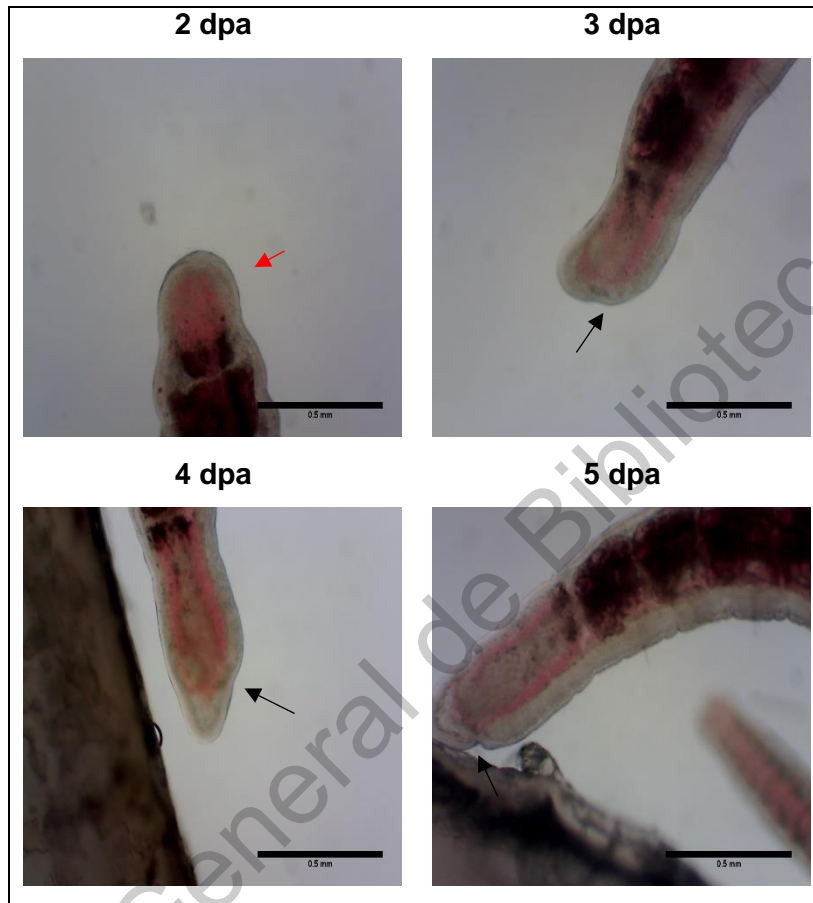


Figura 9. Regeneración de protostomio/peristomio en *Lumbricus variegatus*. Se muestra la regeneración desde el día 2 dpa hasta el día 5 dpa. Las flechas negras indican la formación del peristomio, la flecha roja indica el blastema. Escala (0.5 mm).

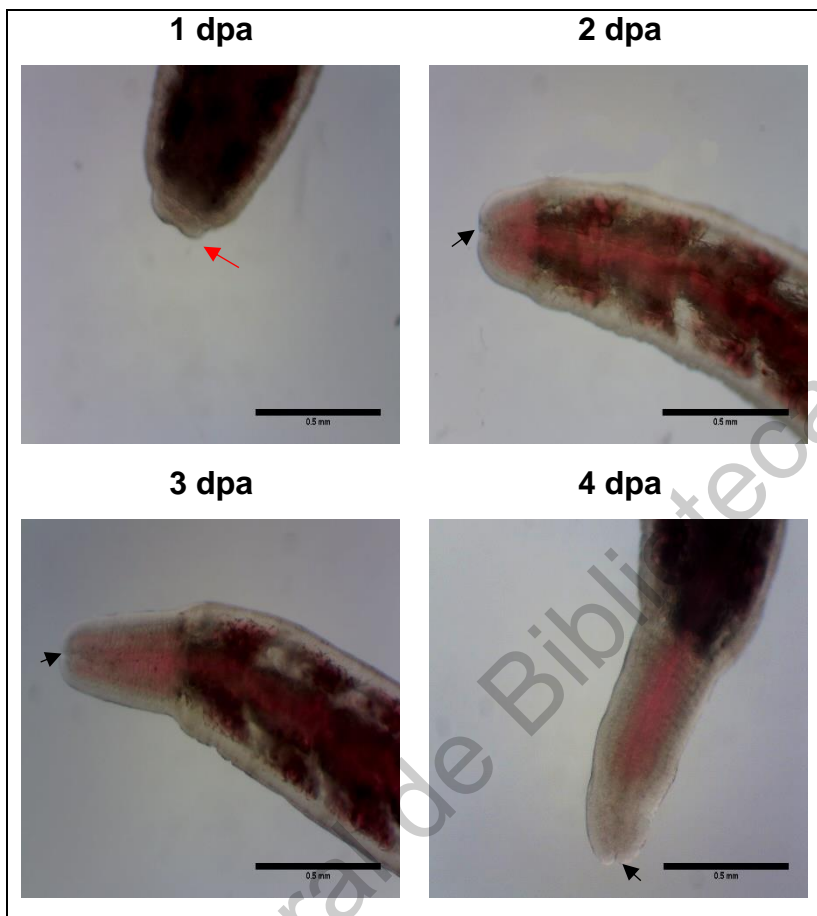


Figura 10. Regeneración posterior de *Lumbriculus variegatus*. La imagen muestra la regeneración de la región posterior, las flechas indican la formación del ano. Flecha roja: blastema, flecha negra: ano. Escala: 0.5 mm

En lo que refiere al proceso de segmentación, la extremidad posterior adquiere los segmentos mucho más rápido que la extremidad anterior. Primero se describirá los eventos de la región posterior, durante el 4 dpa se comienzan a distinguir pequeños segmentos en la zona regenerada, del día 5 al 14 se incorporan nuevos segmentos (Figura 11b), la característica de estos, es que los más proximales a la región del corte presentan mayor proporción con el paso del tiempo y los recién incorporados o en la zona de crecimiento tienen una proporción menor. Por el contrario, en la región anterior se observaron pequeños pliegues en el tejido superficial durante el día 5 dpa. Entre el día 6 y 7 estos pliegues se hacen más notables y se diferencian conjuntamente en los ocho segmentos de la cabeza. Durante los días posteriores estos incrementan de tamaño (Figura 11a).

Respecto a la pigmentación de *Lumbriculus variegatus*, no se observó un patrón similar en todos los oligoquetos, este evento únicamente se observó en algunos individuos de uno de los experimentos realizados. Durante el día 9 se observaron células pigmentarias en la región regenerada de la extremidad posterior, con el paso de los días la proporción de estos incrementó; sin embargo, no se puede descartar que estos pigmentos podrían haber migrado del tejido adyacente (Figura 12).

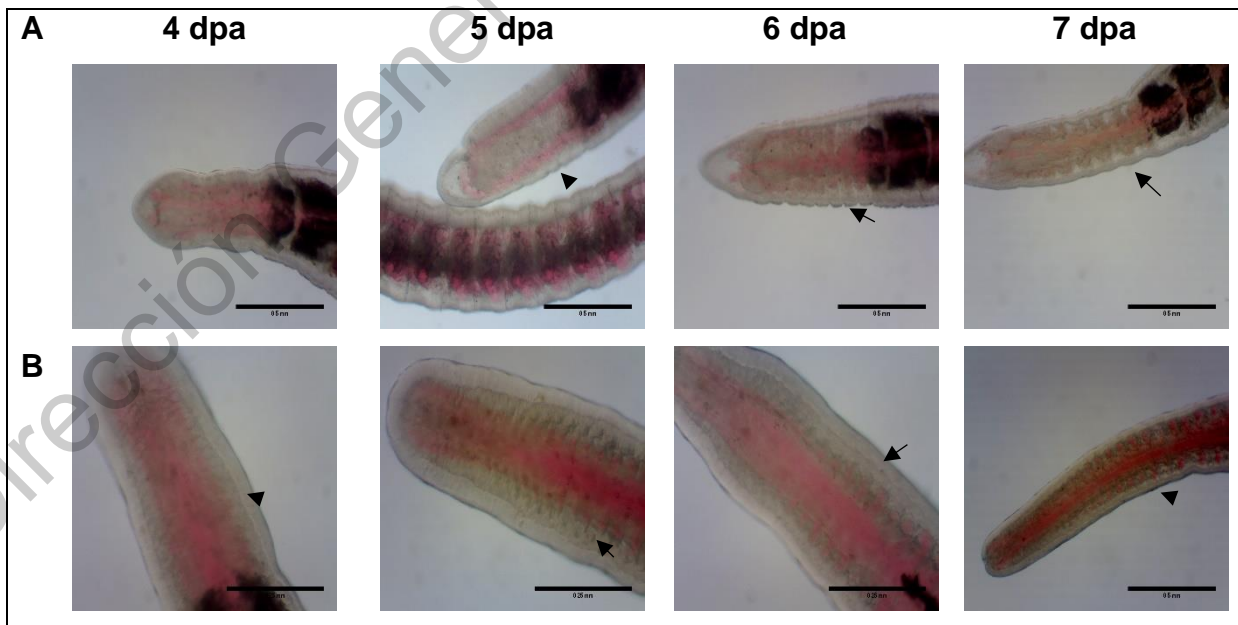


Figura 11. Segmentación de *Lumbriculus variegatus*. La imagen muestra la segmentación de la región (A) región anterior y (B) región. dpa (días post-amputación), escala (0.5 mm). Las flechas indican la región del corte.

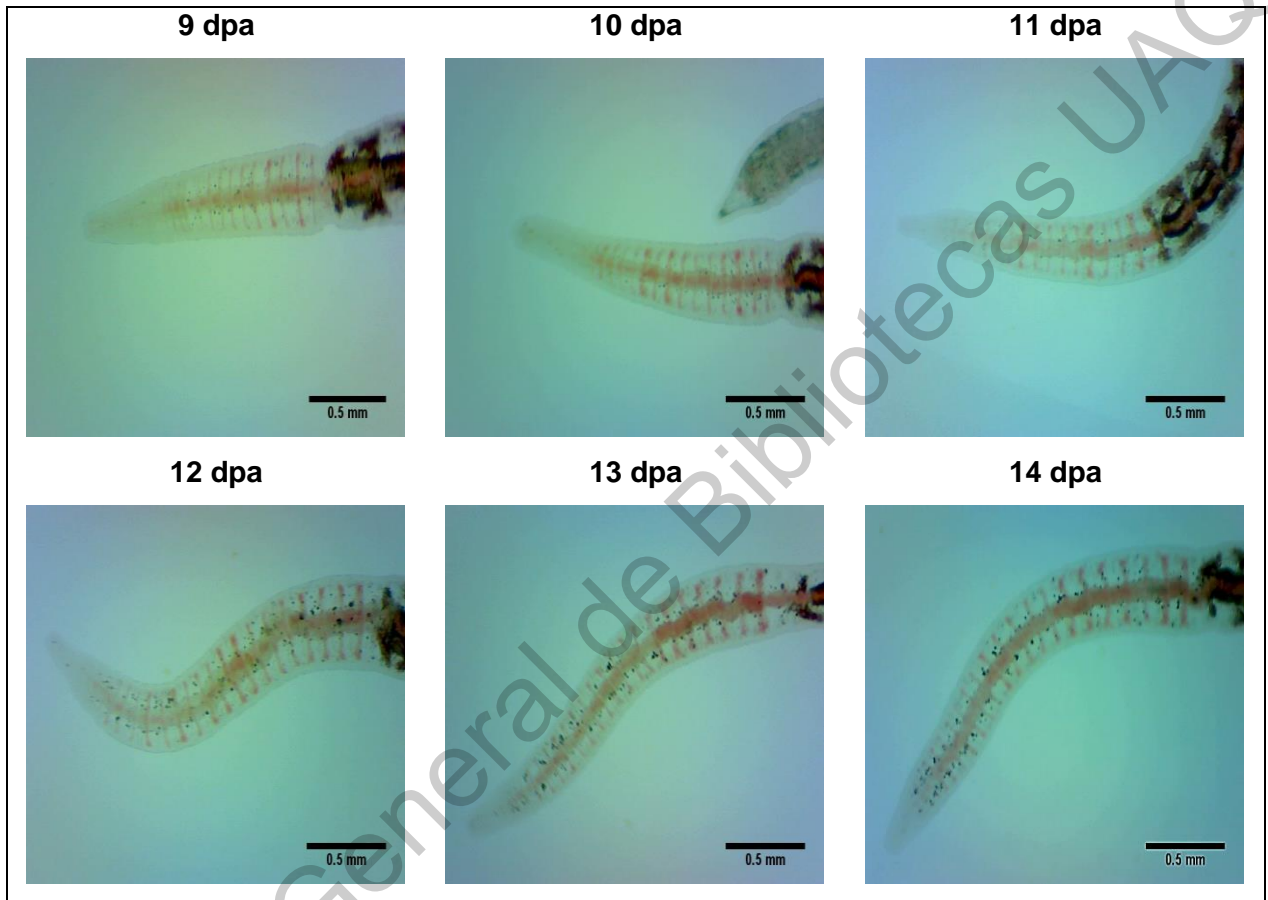


Figura 12. Pigmentación de la región posterior. La imagen muestra la pigmentación en la región posterior de *Lumbriculus variegatus* del día 9 posterior a la amputación hasta el día 14. dpa (días post-amputación), escala (0.5 mm)

6.2 Efecto de la administración de 0.05 mg/ml de ácido fólico en la regeneración anterior y posterior de *Lumbriculus variegatus*

Primero se determinó si la administración de ácido fólico (AF) influía en la regeneración anterior y posterior. Se empleó esta concentración debido a que se habían probado concentraciones cercanas a esta en *Tubifex* y se determinó una diferencia entre en el grupo con tratamiento. Posterior a la amputación de cada oligoqueto, se incorporó la concentración 0.05 mg/ml de AF durante 14 días en el grupo experimental y al control únicamente se le administró el disolvente NaOH 0.001 M.

Primero se describirán los resultados de la región anterior. La Figura 13 muestra la regeneración anterior durante los primeros 14 días. El grupo control se muestra del lado izquierdo y el grupo experimental del lado derecho. Durante los primeros días no se observan diferencias entre grupos. Se puede apreciar una proporción un poco mayor en el grupo experimental a partir de 7 dpa; sin embargo, el análisis de RM-ANOVA no mostró diferencias en la regeneración entre el control y el tratamiento ($P=0.172$). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas totales en la regeneración entre los grupos (Tabla 3), se realizaron comparaciones por grupos para determinar si existían diferencias en los distintos días de regeneración entre los tratamientos. De igual manera, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 4a y Figura 15a).

Respecto a la región posterior, la Figura 14 muestra las imágenes obtenidas de la regeneración posterior. Se puede apreciar un ligero incremento en la regeneración a partir del 7 dpa. Sin embargo, los resultados obtenidos en el análisis de medidas repetidas (RM-ANOVA) no mostraron diferencias significativas sobre la regeneración (Tabla 3). En los análisis por día únicamente fue significativo el día 7 ($P=0.0286$) (Tabla 4b y Figura 15b). Durante el bioensayo se observaron algunas características importantes: del 10 dpa al 14 dpa se observa que la variación en la regeneración es mayor a comparación de los primeros días de regeneración. Esto fue más notable en la extremidad posterior que en la región anterior donde solo se recuperan ocho segmentos de cabeza (Figura 15a y Figura 15b).

Resultados RM-ANOVA			
	gl	f	p
Extremidad anterior	1	1.957	0.172
Extremidad posterior	1	3.569	0.067

Tabla 3. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo de 0.05 mg/ml de ácido fólico.

A) Resultados anteriores				B) Resultados posteriores			
Día	chi-squared	df	p-value	Día	chi-squared	df	p-value
Día 3	0.20592	1	0.65	Día 3	0.17905	1	0.6722
Día 4	0.71623	1	0.3974	Día 4	0.6318	1	0.4267
Día 5	0.86279	1	0.353	Día 5	0.33144	1	0.5648
Día 6	0.032737	1	0.8564	Día 6	0.30401	1	0.5814
Día 7	1.7337	1	0.1874	Día 7	5.1044	1	0.0286
Día 10	2.1714	1	0.1406	Día 10	1.7715	1	0.1832
Día 11	1.3334	1	0.2482	Día 11	1.5824	1	0.2084
Día 12	1.3335	1	0.2482	Día 12	1.5823	1	0.2084
Día 13	0.094345	1	0.7587	Día 13	0.05362	1	0.8169
Día 14	0.58588	1	0.444	Día 14	0.14959	1	0.6989

Tabla 4a y 4b. Resultados del análisis por día, bioensayo de 0.05mg/ml de ácido fólico.

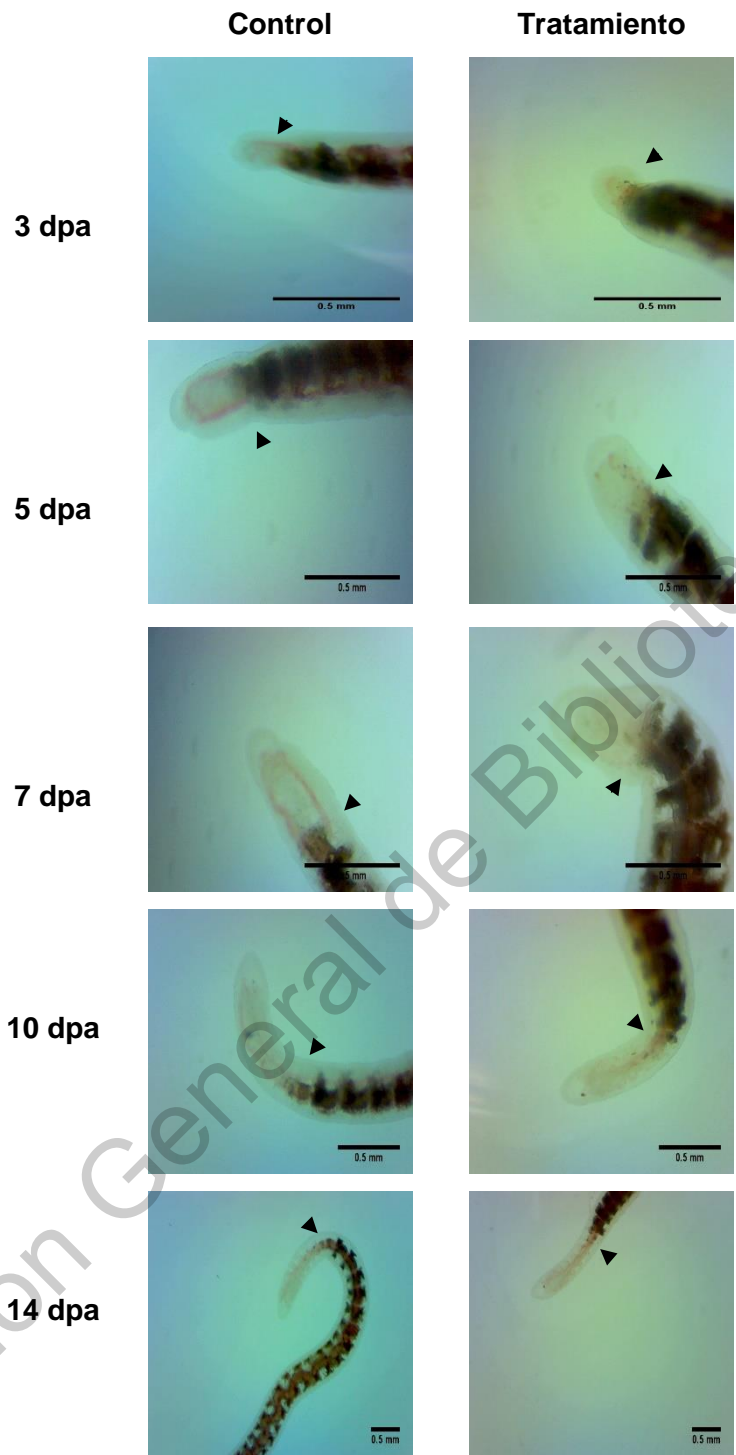


Figura 13. Efecto de la administración de 0.05 mg/ml de Ácido fólico en la regeneración anterior de *Lumbriculus variegatus*. Del lado izquierdo se muestran las cabezas regeneradas del grupo control las cuales contenían 0.001 M de NaOH y del lado derecho se encuentra el grupo experimental al cual se le administró una solución que contenía 0.001 M de NaOH y 0.05 mg/ml de ácido fólico. La tasa de regeneración se determinó del día 3 al 7 y del 10 al 14. Las flechas indican el punto de corte. dpa(días post-amputación), escala (0.5 mm). n=20

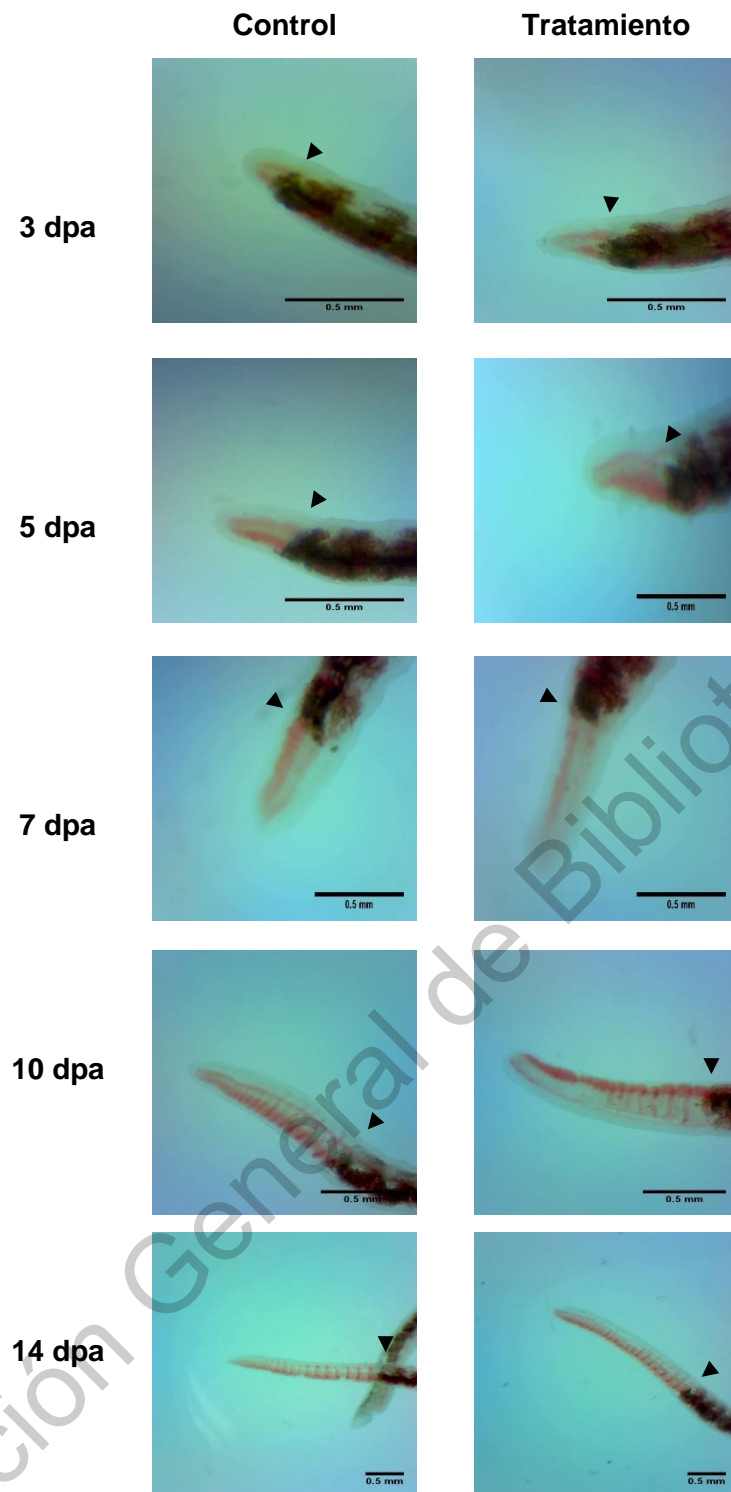


Figura 14. Efecto de la administración de 0.05 mg/ml de ácido fólico en la regeneración posterior de *Lumbriculus variegatus*. Del lado izquierdo se muestran las colas regeneradas del grupo control las cuales contenían 0.001 M de NaOH y del lado derecho se encuentra el grupo experimental al cual se le administró una solución que contenía 0.001 M de NaOH y 0.05 mg/ml de ácido fólico. La tasa de regeneración se determinó del día 3 al 7 y del 10 al 14. Las flechas indican el punto de corte. dpa(días post-amputación), escala 0.5 mm. n=20

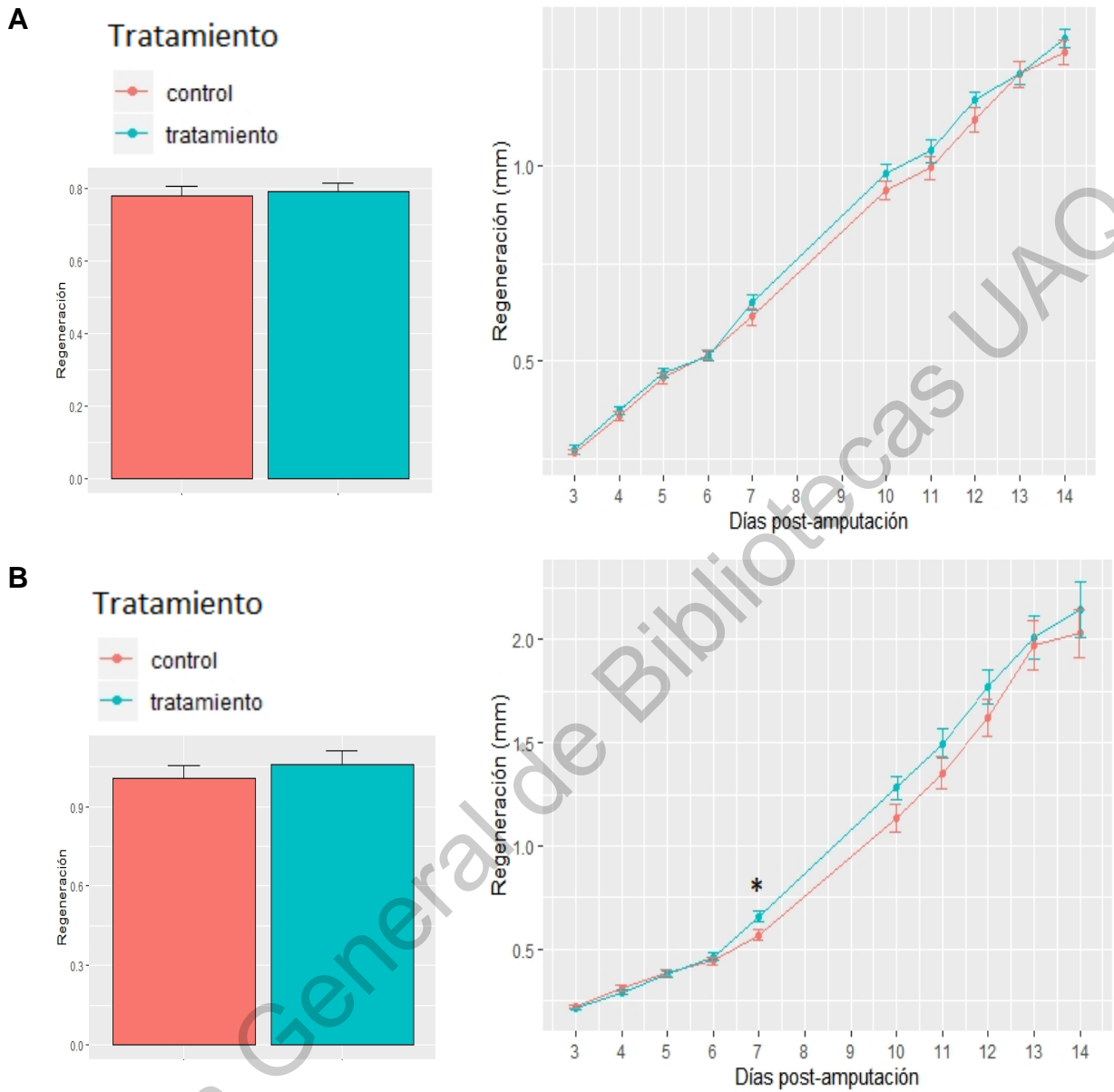


Figura 15. Efecto de la administración de 0.05 mg/ml de Ácido fólico en la regeneración de *Lumbriculus variegatus*. La tasa de regeneración se determinó del día 3 al 7 y del 10 al 14. A) Regeneración anterior y B) regeneración posterior. Los datos se compararon con una prueba de ANOVA de medidas repetidas y la significancia entre días se determinó con una prueba de Kruskal-Wallis. $P < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$, $< 0.001^{***}$. Barras de error estándar (SE), $n=20$ para cada grupo.

6.3 Efecto de la administración de 0.1 mg/ml de ácido fólico en la regeneración anterior y posterior de *Lumbriculus variegatus*

Se repitió el experimento anterior incrementando la concentración a 0.1 mg/ml de AF en el grupo experimental y en el grupo control únicamente se incorporó 0.0001 M de NaOH. Se determinó la tasa de regeneración durante 14 días consecutivos.

Respecto a la regeneración anterior, la Figura 16 muestra la regeneración durante los primeros 12 días. El grupo control se muestra del lado izquierdo y el grupo experimental del lado derecho, en las imágenes no se observa diferencias morfológicas entre grupos. En el análisis RM-ANOVA no se determinó diferencias totales en la regeneración entre el grupo control y el experimental (Tabla 5). A diferencia del RM-ANOVA, los análisis por día mostró diferencia significativa en el 5 dpa ($P=0.01525$). Posterior a estos días no se mostraron más diferencias (Tabla 6a y Figura 18a).

Respecto a la extremidad posterior, la Figura 17 muestra las imágenes obtenidas de la regeneración posterior. En las imágenes se puede distinguir un ligero incremento en el grupo experimental a comparación del grupo control. Los resultados del RM-ANOVA no mostraron diferencias significativas totales en la regeneración entre grupos (Tabla 5). A diferencia, los análisis por día, mostraron diferencias significativas en los días 2, 3, 5, 7 (Tabla 6b y Figura 18b). Posterior a estos días no se mostraron diferencias significativas.

La región anterior mostró menos variación entre los diferentes individuos a comparación de la región posterior donde la variación incrementa a partir del día 9. En este trabajo no se determinaron el número de segmentos obtenidos en la región posterior al final del experimento; sin embargo, en la Figura 17 se puede observar una mayor cantidad de segmentos en la región posterior en el grupo experimental.

Resultados RM-ANOVA			
	gl	f	p
Extremidad anterior	1	0.001	0.982
Extremidad posterior	1	1.896	0.187

Tabla 5. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo 0.1 mg/ml de ácido fólico.

A) Resultados anteriores				B) Resultados posteriores			
Día	chi-squared	df	p-value	Día	chi-squared	df	p-value
Día 1	2.6891	1	0.101	Día 1	3.0789	1	0.0793
Día 2	1.8909	1	0.1691	Día 2	7.2149	1	0.00723
Día 3	2.4194	1	0.1198	Día 3	10.43	1	0.00124
Día 4	3.4846	1	0.06194	Día 4	3.3625	1	0.0667
Día 5	5.887	1	0.01525	Día 5	5.6604	1	0.01735
Día 6	3.5499	1	0.05955	Día 6	1.2057	1	0.2722
Día 7	0.6844	1	0.4081	Día 7	6.6207	1	0.01008
Día 8	0.072704	1	0.7874	Día 8	1.7143	1	0.1904
Día 9	1.6023	1	0.2056	Día 9	1.8916	1	0.169
Día 10	0.22753	1	0.1266	Día 10	1.0522	1	0.305
Día 11	2.3333	1	0.1266	Día 11	1.6019	1	0.2056
Día 12	0.57943	1	0.4465	Día 12	2.6627	1	0.1027
				Día 13	1.8467	1	0.1742
				Día 14	1.216	1	0.2701

Tabla 6a y 6b. Resultados del análisis por día, bioensayo 0.1 mg/ml de ácido fólico.

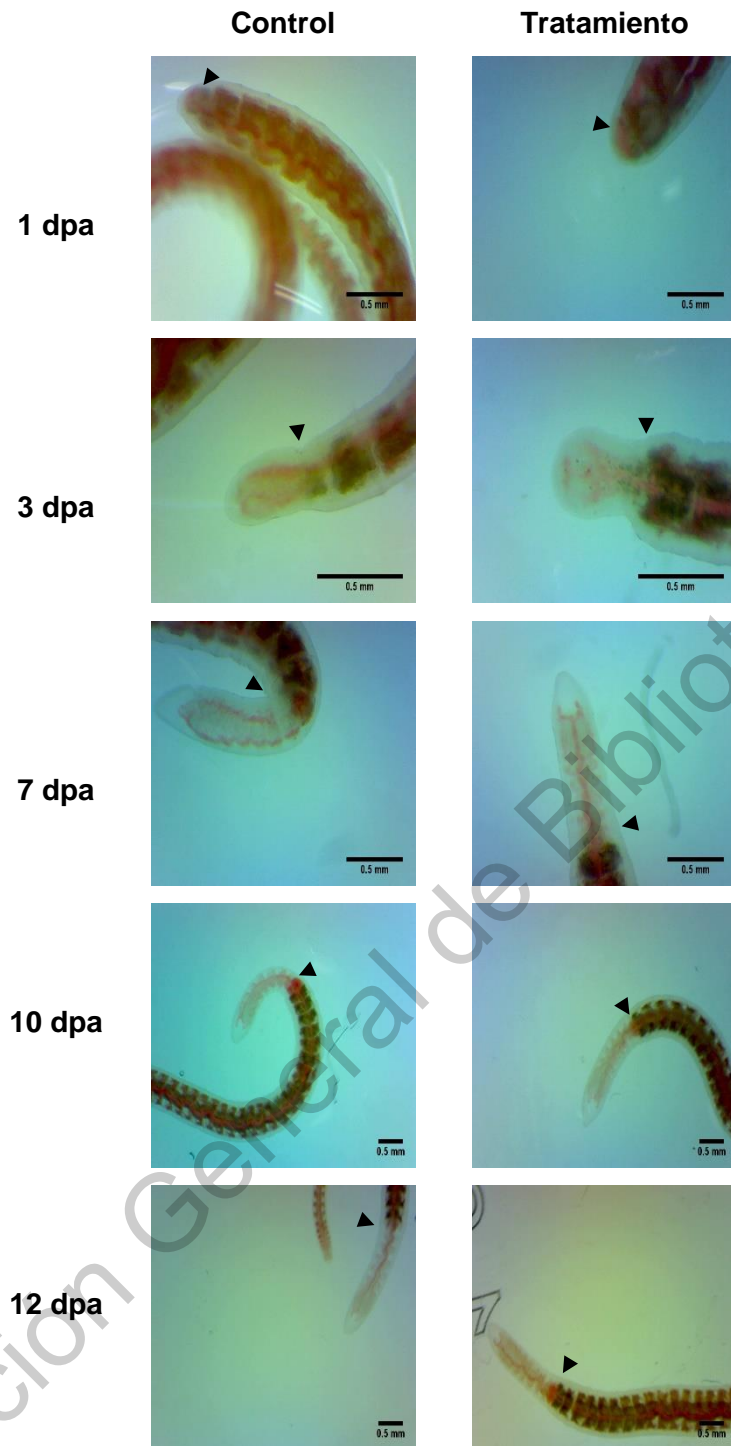


Figura 16. Efecto de la administración de 0.1 mg/ml de ácido fólico en la regeneración anterior de *Lumbriculus variegatus*. Del lado izquierdo se muestran las cabezas regeneradas del grupo control las cuales contenían 0.0001 M de NaOH y del lado derecho se encuentra el grupo experimental al cual se le administró una solución que contenía 0.0001 M de NaOH y 0.1 mg/ml de ácido fólico. La tasa de regeneración se determinó durante 14 días consecutivos. Las flechas negras indican el punto de corte. dpa (días post-amputación), escala 0.5 mm. n=15

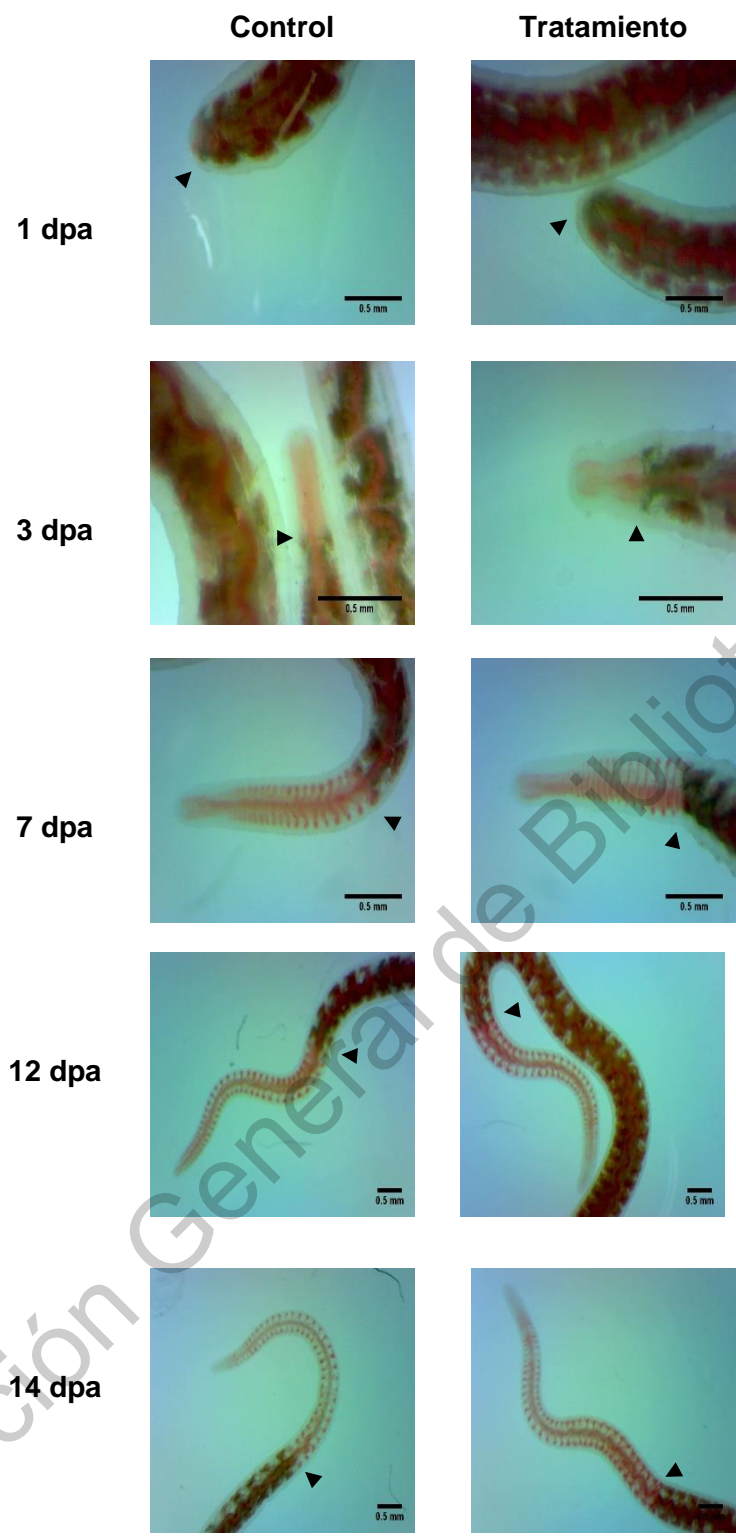


Figura 17 . Efecto de la administración de 0.1 mg/ml de ácido fólico en la regeneración posterior de *Lumbriculus variegatus* Del lado izquierdo se muestran las colas regeneradas del grupo control las cuales contenían 0.0001 M de NaOH y del lado derecho se encuentra el grupo experimental al cual se le administró una solución que contenía 0.0001 M de NaOH y 0.1 mg/ml de ácido fólico. Las placas se incubaron a 20°C durante todo el experimento. La tasa de regeneración se determinó durante 14 días consecutivos. Las flechas negras indican el punto de corte. Dpa (días post-amputación), escala 0.5 mm. n=15

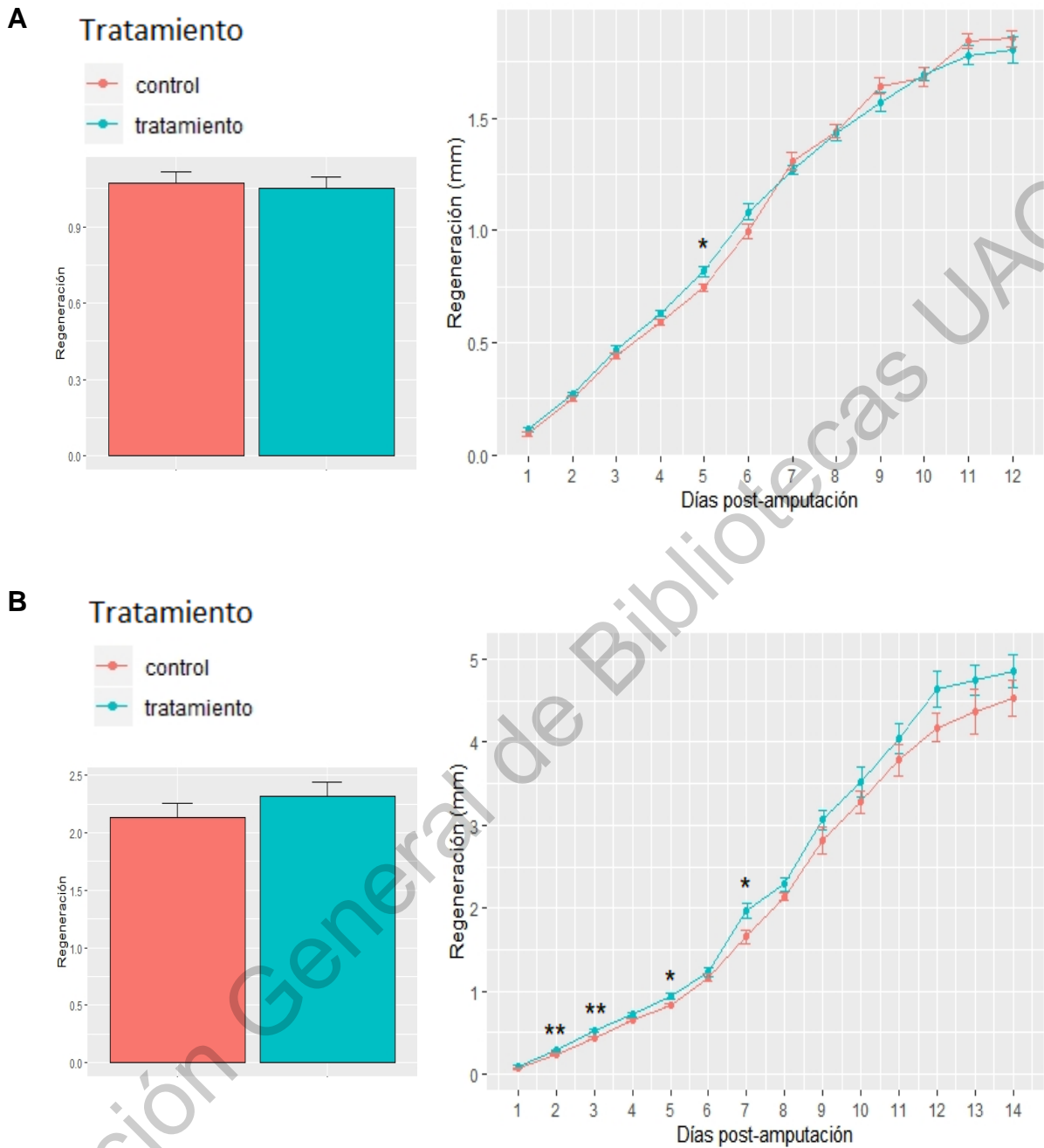


Figura 18. Efecto de la administración de 0.1 mg/ml de Ácido fólico en la regeneración de *Lumbriculus variegatus*. La tasa de regeneración se determinó durante 14 días consecutivos. A) Regeneración anterior y B) regeneración posterior. Los datos se compararon con un ANOVA de medidas repetidas y la significancia entre días se determinó con una prueba de Kruskal-Wallis. P (<0.05*, <0.01**, <0.001***). Barras de error estándar (SE), n=15 para cada grupo.

6.4 Efecto de la administración de 30 μ M 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior y posterior

Se determinó el efecto de la administración del inhibidor de metiltransferasas 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) en la regeneración anterior y posterior. En este bioensayo se quería determinar si la administración de decitabina 24 horas previas a la amputación podría alterar la regeneración, también se exploró el efecto de la administración prolongada del inhibidor. Para esto se emplearon tres grupos: al grupo control únicamente se le administro del diluyente del fármaco DMSO 0.013% durante los 14 días que duró el experimento. Al segundo grupo (24 horas), se le incorporaron 30 μ M de decitabina durante 24 horas previas a la amputación, posterior a este periodo únicamente se le incorporó 0.013% de DMSO. Al tercer grupo (14 días), se le administraron 30 μ M Decitabina durante los 14 días del experimento.

La Figura 19 muestra las imágenes obtenidas de la regeneración anterior. Del lado izquierdo se encuentra el grupo control, en el centro el grupo al cual se le administró decitabina únicamente 24 horas previas a la amputación y del lado derecho el grupo al cual se le administró el inhibidor durante todo el experimento. Las imágenes no muestran diferencias entre el grupo control y el grupo 24 horas. En el grupo 14 días, se observa una menor proporción en la regeneración a comparación de los otros grupos. Los resultados del RM-ANOVA no mostró diferencias totales en la regeneración entre grupos (Tabla 7) Los análisis por día tampoco mostraron diferencias significativas entre días (Tabla 8a y Figura 21a).

La Figura 20 muestra las imágenes obtenidas de la regeneración posterior. En esta figura se puede observar que los grupos control y 24 horas no presentan diferencias notables. El grupo de 14 días muestra una tendencia menor en la regeneración aproximadamente desde el día 7. Los resultados obtenidos del RM-ANOVA no mostraron resultados significativos entre grupos (Tabla 7). En los análisis por día se determinó diferencia significativa entre el control y el grupo "14 días" durante los días 7, 12 y 13 (Tabla 8b y Figura 21b).

Resultados RM-ANOVA			
	gl	f	p
Extremidad anterior	2	0.007	0.993
Extremidad posterior	2	2.442	0.121

Tabla 7. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo de 30 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina

A) Resultados anteriores					B) Resultados posteriores					
Grupo	Día	chi-squared	df	p-value	Grupo	Día	chi-squared	df	p-value	
Control - 24horas	Día 1	0.42667	1	0.5136	Control - 24horas	Día 2	1.641	1	0.2002	
	Día 2	0.23158	1	0.6304		Día 5	0.025641	1	0.8728	
	Día 5	0.10256	1	0.7488		Día 6	0	1	1	
	Día 6	0	1	1		Día 7	0	1	1	
	Día 7	0.13333	1	0.715		Día 9	0.10256	1	0.7488	
	Día 9	0.033333	1	0.8551		Día 12	0.025641	1	0.8728	
	Día 12	4.3333	1	0.3737		Día 13	0.41026	1	0.5218	
	Día 13	0.92308	1	0.3367		Día 14	0.10256	1	0.7488	
	Día 14	1.2564	1	0.2623		Control -14 días	Día 2	0.020521	1	0.8861
	Control -14 días	Día 1	0.45247	1			0.5012	Día 5	3.5119	1
Día 2		0.15033	1	0.6982	Día 6		3.5119	1	0.06093	
Día 5		0.6	1	0.4386	Día 7		6.667	1	0.009823	
Día 6		0.4144	1	0.5197	Día 9		3.2739	1	0.07039	
Día 7		0.026466	1	0.8708	Día 12		5.4	1	0.02014	
Día 9		0.2667	1	0.6056	Día 13		4	1	0.0455	
Día 12		1.35	1	0.2453	Día 14		2.4694	1	0.1161	
Día 13		0.81667	1	0.3662	14 días -24horas	Día 2	2.4694	1	0.1161	
Día 14	0.41667	1	0.5186	Día 5		3.2667	1	0.0707		
14 días -24horas	Día 1	0.11312	1	0.7366		Día 6	2.6099	1	0.1062	
	Día 2	0.037749	1	0.8459		Día 7	3.75	1	0.05281	
	Día 5	0.41667	1	0.5186		Día 9	2.4053	1	0.1209	
	Día 6	0.18367	1	0.6682		Día 12	2.4	1	0.1213	
	Día 7	0.5102	1	0.4751		Día 13	2.7064	1	0.09995	
	Día 9	0.021429	1	0.8836		Día 14	2.9388	1	0.08648	
	Día 12	0.6	1	0.4386						
	Día 13	0.15	1	0.6985						
Día 14	2.4	1	0.1213							

Tabla 8a y 8b. Resultados del análisis por día, bioensayo de 30 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina

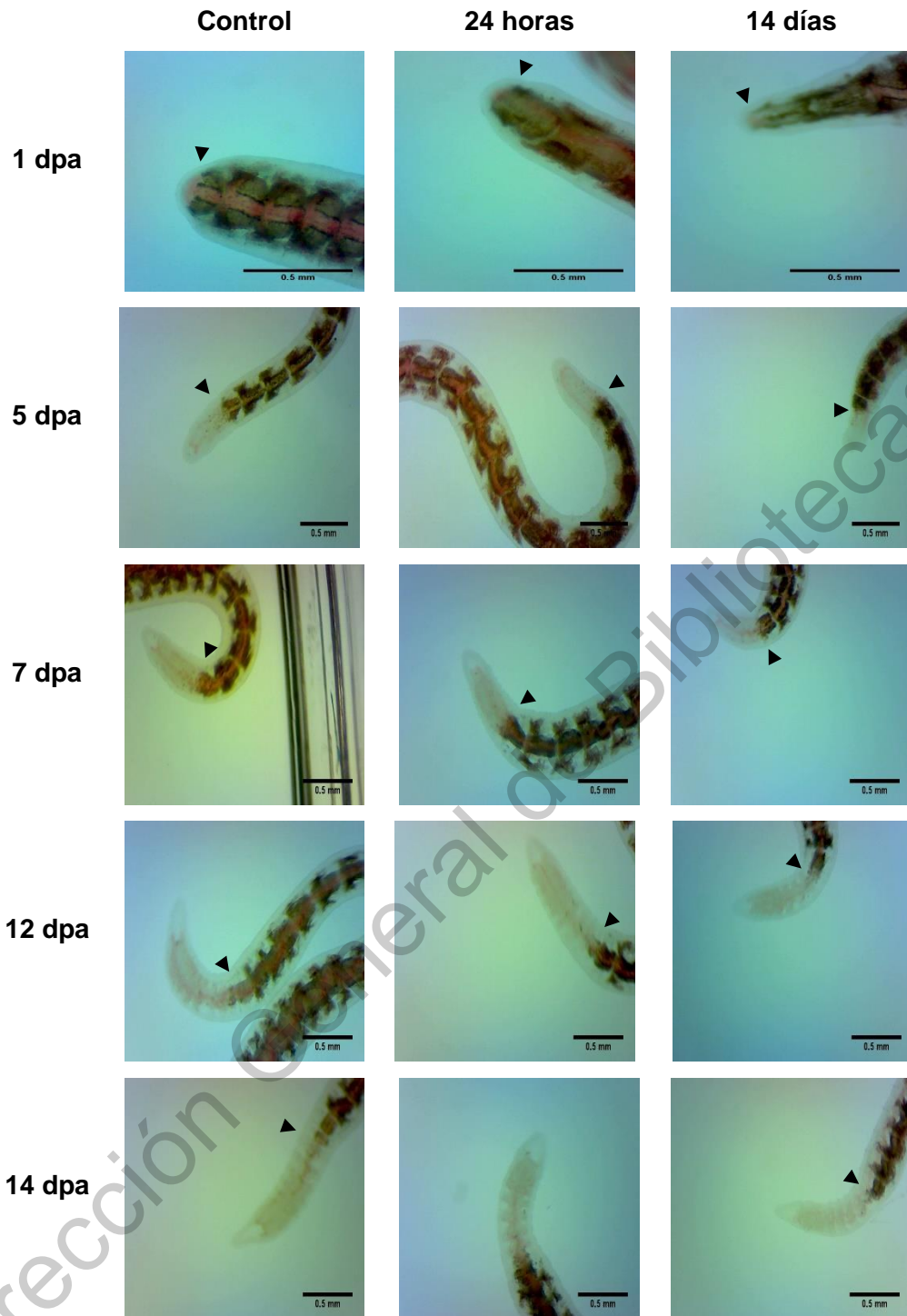


Figura 19. Efecto de la administración de 30 μ M 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior de *Lumbriculus variegatus*. Se seleccionaron oligoquetos adultos a los cuales se les realizó un corte medial. Se colocaron tres grupos: al control se le administró diariamente 0.013% de DMSO, al grupo dos (24 horas) se administró aza-2'-desoxicitidina durante 24 horas previas al corte. Al tercer grupo (14 días) se le administró 30 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina durante todo el experimento. Las placas se incubaron a 20°C durante todo el experimento. La tasa de regeneración se determinó del día uno al dos, del 5 al 9 y del 12 al 14. Las flechas indican el punto de corte. Escala (0.5 mm). n=5

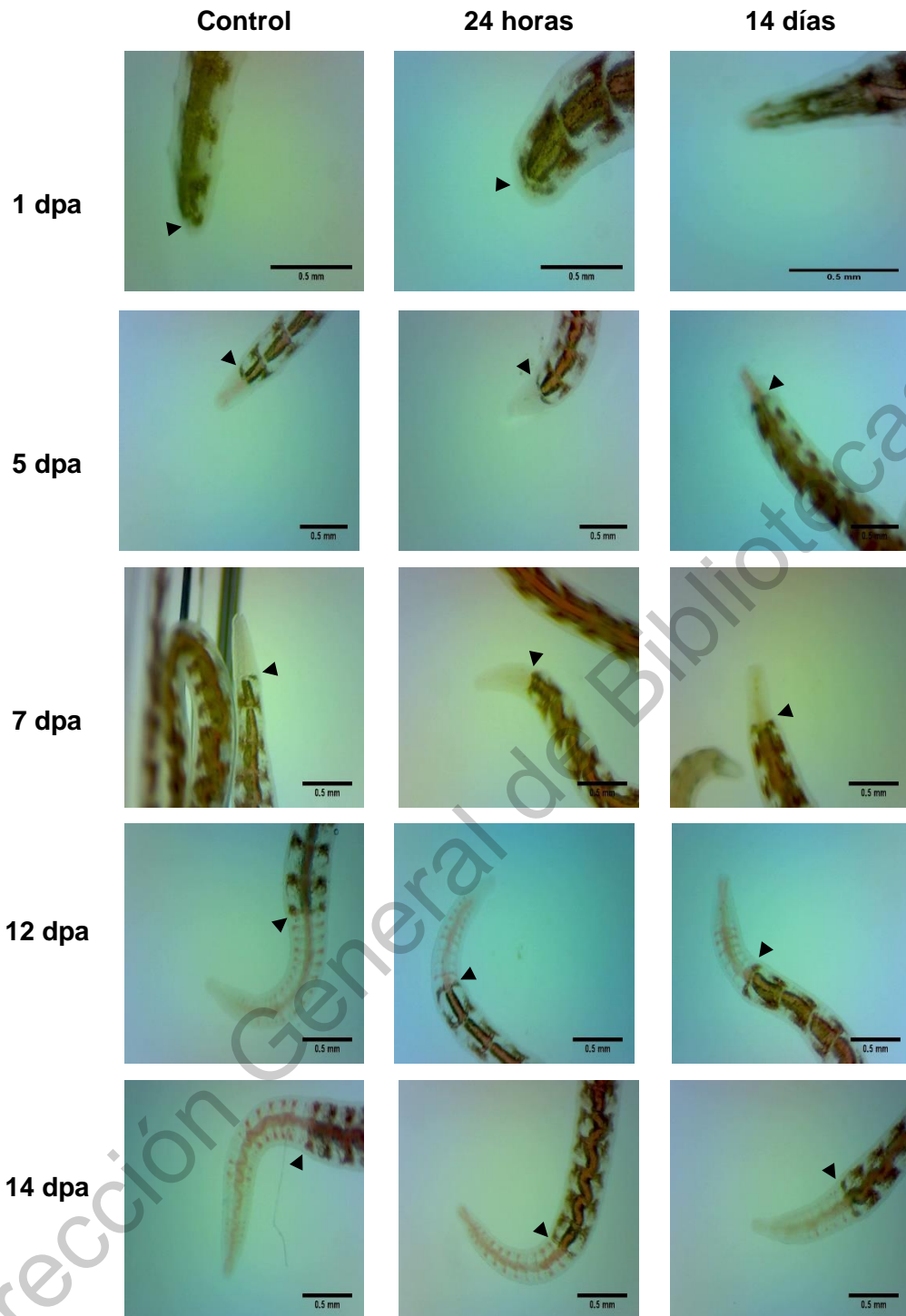


Figura 20. Efecto de la administración de 30 μ M 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración posterior de *Lumbriculus variegatus*. Se seleccionaron oligoquetos adultos a los cuales se les realizó un corte medial. Se colocaron tres grupos: al control se le administró diariamente 0.013% de DMSO, al grupo dos (24 horas) se administró aza-2'-desoxicitidina durante 24 horas previas al corte. Al tercer grupo (14 días) se le administro 30 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina durante todo el experimento. Las placas se incubaron a 20°C durante todo el experimento. La tasa de regeneración se determinó del día uno al dos, del 5 al 9 y del 12 al 14. Las flechas indican el punto de corte. Escala (0.5 mm). n=5

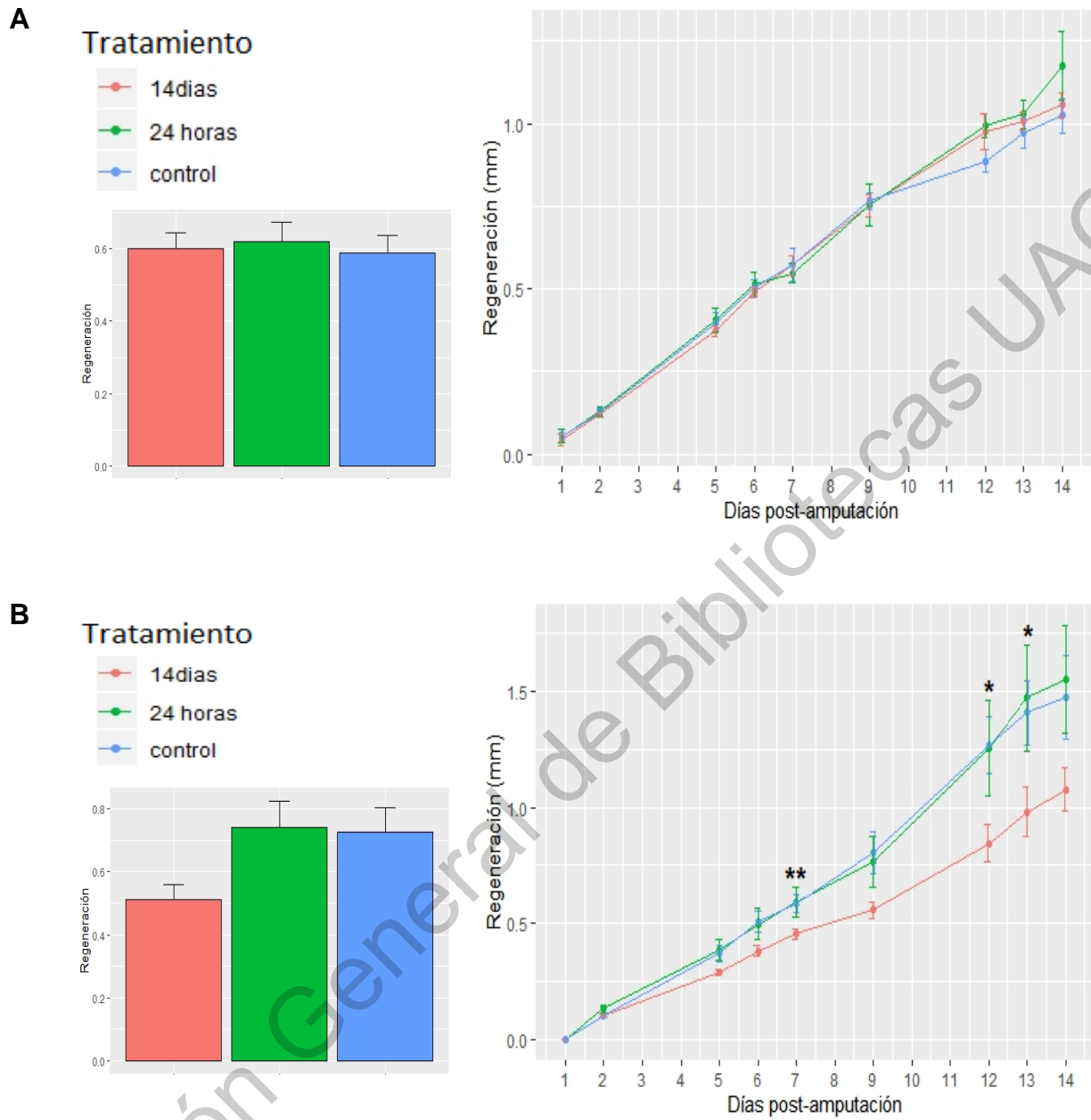


Figura 21. Efecto de la administración de 30 μM de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de *Lumbriculus variegatus*. La tasa de regeneración se determinó del día uno al dos, del 5 al 9 y del 12 al 14. A) Regeneración anterior y B) regeneración posterior. Los datos se compararon con un ANOVA de medidas repetidas y la significancia entre días se determinó con una prueba de Kruskal-Wallis. P (<0.05*, <0.01**, <0.001***). Barras de error estándar (SE). N=5 para cada grupo.

6.5 Efecto de la administración de 100 μ M 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior y posterior

Como en el bioensayo de 30 μ M de Decitabina se encontró un descenso en la regeneración en el grupo al cual se le administró el tratamiento durante 14 días, se decidió repetir el bioensayo incrementando la concentración a 100 μ M de Decitabina. Como no se logró determinar que el tratamiento con decitabina durante las 24 horas previas a la amputación podía tener efecto en la regeneración, se decidió explorar el efecto de la administración del fármaco durante las primeras 24 horas de regeneración.

La Figura 22 muestra las imágenes obtenidas de la regeneración anterior. En las imágenes se puede apreciar que tienen una proporción similar en la regeneración los tres grupos experimentales. El análisis de RM-ANOVA, mostró una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo 14días (Tabla 9). Respecto a los análisis por día se determinó diferencia significativa entre el grupo control y el grupo "14 días" durante los 6, 7, 10 y 13 dpa y diferencia significativa entre el grupo control y el grupo 24 horas únicamente en el día 6 y 13 (Tabla 10a y Figura 24a).

La Figura 23 muestra las imágenes obtenidas de la regeneración de la extremidad posterior. En la Figura se puede observar diferencia en la regeneración entre el grupo control y el grupo de "24 horas". Esta disminución en la regeneración se hizo más notable en el grupo al que se le administró el tratamiento con decitabina durante 14 días consecutivos. Esta diferencia se logra apreciar desde 5 dpa. Algunas características importantes por mencionar es que respecto a la segmentación de este grupo, el número de segmentos incorporados fue menor a comparación del control, además de esto, los segmentos presentes en la zona recién regenerada tenían un menor tamaño a comparación de los otros grupos. Los resultados del RM-ANOVA no indicaron una diferencia entre el grupo control y el grupo 24 horas; sin embargo, se encontró diferencia significativa entre el control y el grupo "14 días" y con el grupo 24 horas y 14días (Tabla 9). Los resultados del análisis por día determinaron diferencia significativa entre el grupo control y el grupo "14 días" desde el día 5 hasta el 14. También se determinó una diferencia significativa entre el grupo

24 horas y 14 días desde el día 8 hasta el 14. Respecto al grupo control y 24 horas únicamente se determinó diferencia en el día 7 y 8 (Tabla 10b y Figura 24b).

En resumen, el análisis estadístico indicó que el tratamiento con decitabina durante 14 días tiene un efecto negativo sobre la regeneración. Estos resultados muestran que el efecto del fármaco a partir del día 5 dpa en ambas regiones; sin embargo, el efecto en la región posterior es más marcado.

Con base en los resultados obtenidos, se repitió el bioensayo con el tamaño mínimo de muestra. En este ensayo únicamente se emplearon dos grupos: el grupo control y el efecto de la administración durante 14 días consecutivos. La Figura 25 muestra las imágenes de la regeneración anterior. No se observan diferencias morfológicas entre extremidades. El análisis RM-ANOVA no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el tratamiento (Tabla 11). El análisis estadístico de los días no mostro diferencia significativa (Tabla 12a y Figura 27a).

Respecto a la regeneración posterior. La Figura 26, muestra las imágenes obtenidas de la regeneración de la extremidad posterior. Se observó una menor proporción de regeneración en el grupo experimental a comparación del grupo control. Como en el ensayo anterior, también se observó un menor número de segmentos en algunas de las réplicas y segmentos de menor tamaño. El RM-ANOVA mostró diferencia significativa en la regeneración total entre el grupo control y el tratamiento (Tabla 11). El análisis por día indicó diferencias significativas en el 3, 5, 6, 8, 14 dpa (Tabla 12b y Figura 27b). En resumen la administración de decitabina tuvo efecto negativo sobre la regeneración de la extremidad posterior después del 3 dpa.

Resultados RM-ANOVA				
	gl	f	Grupo	p
Extremidad anterior	2	4.758	Control - 24horas	0.081
			Control - 14días	0.049
			14 días - 24horas	1
Extremidad posterior	2	13.702	Control - 24horas	0.139
			Control - 14días	0.001
			14 días - 24horas	0.03

Tabla 9. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (5 réplicas).

Resultados anteriores					Resultados posteriores				
Grupo	Día	chi-squared	df	p-value	Grupo	Día	chi-squared	df	p-value
Control - 24horas	Día 1	0.32548	1	0.5683	Control - 24horas	Día 2	3.3333	1	0.06789
	Día 2	0	1	1		Día 3	3.0221	1	0.08214
	Día 3	1.2608	1	0.2615		Día 4	2.4193	1	0.1198
	Día 4	0.10256	1	0.7488		Día 5	3.0221	1	0.08214
	Día 5	1.641	1	0.2002		Día 6	1.8549	1	0.1732
	Día 6	6.5632	1	0.0104		Día 7	5.6333	1	0.01762
	Día 7	3.1026	1	0.0781		Día 8	4.8	1	0.02846
	Día 8	3.1026	1	0.07817		Día 9	3.3333	1	0.06789
	Día 9	1.2564	1	0.2623		Día 10	3.333	1	0.06789
	Día 10	2.5641	1	0.1093		Día 11	1.6333	1	0.2012
	Día 11	0.64103	1	0.4233		Día 12	0.27227	1	0.6015
	Día 12	1.641	1	0.2002		Día 13	2.2273	1	0.1356
	Día 13	6.5871	1	0.01027		Día 14	2.7	1	0.1003
	Día 14	2.0769	1	0.1495		Control - 14días	Día 2	0.13333	1
Control - 14días	Día 1	0.075342	1	0.7837	Día 3		1.8836	1	0.1699
	Día 2	0	1	1	Día 4		2.7	1	0.1003
	Día 3	4.3638	1	0.03671	Día 5		6.5455	1	0.01052
	Día 4	0.10256	1	0.7488	Día 6		4.8109	1	0.02828
	Día 5	1.4474	1	0.229	Día 7		7.5	1	0.00617
	Día 6	4.0333	1	0.04461	Día 8		7.5	1	0.00617
	Día 7	5.0256	1	0.02497	Día 9		7.5	1	0.00617
	Día 8	2.5641	1	0.1093	Día 10		7.5	1	0.00617
	Día 9	3.6923	1	0.05466	Día 11		7.5	1	0.00617
	Día 10	7.4103	1	0.006485	Día 12		6.8182	1	0.009023
	Día 11	2.0769	1	0.1495	Día 13		7.5	1	0.00617
	Día 12	2.8368	1	0.09213	Día 14		7.5	1	0.00617
	Día 13	4.3333	1	0.03737	14 días - 24 horas		Día 2	0.39512	1
	Día 14	0.64103	1	0.4233		Día 3	0.70244	1	0.402
				Día 4		0.53445	1	0.4647	
				Día 5		3.84	1	0.05004	
				Día 6		2.4695	1	0.1161	
				Día 7		3.1527	1	0.0758	
				Día 8		3.9382	1	0.0472	
				Día 9		6.8182	1	0.009023	
				Día 10		6.8182	1	0.009023	
				Día 11		6.8182	1	0.009023	
				Día 12		6.8182	1	0.009023	
				Día 13		6	1	0.01431	
				Día 14		6.8182	1	0.009023	

Tabla 10a y 10b. Resultados del análisis por día, bioensayo 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (5 réplicas).

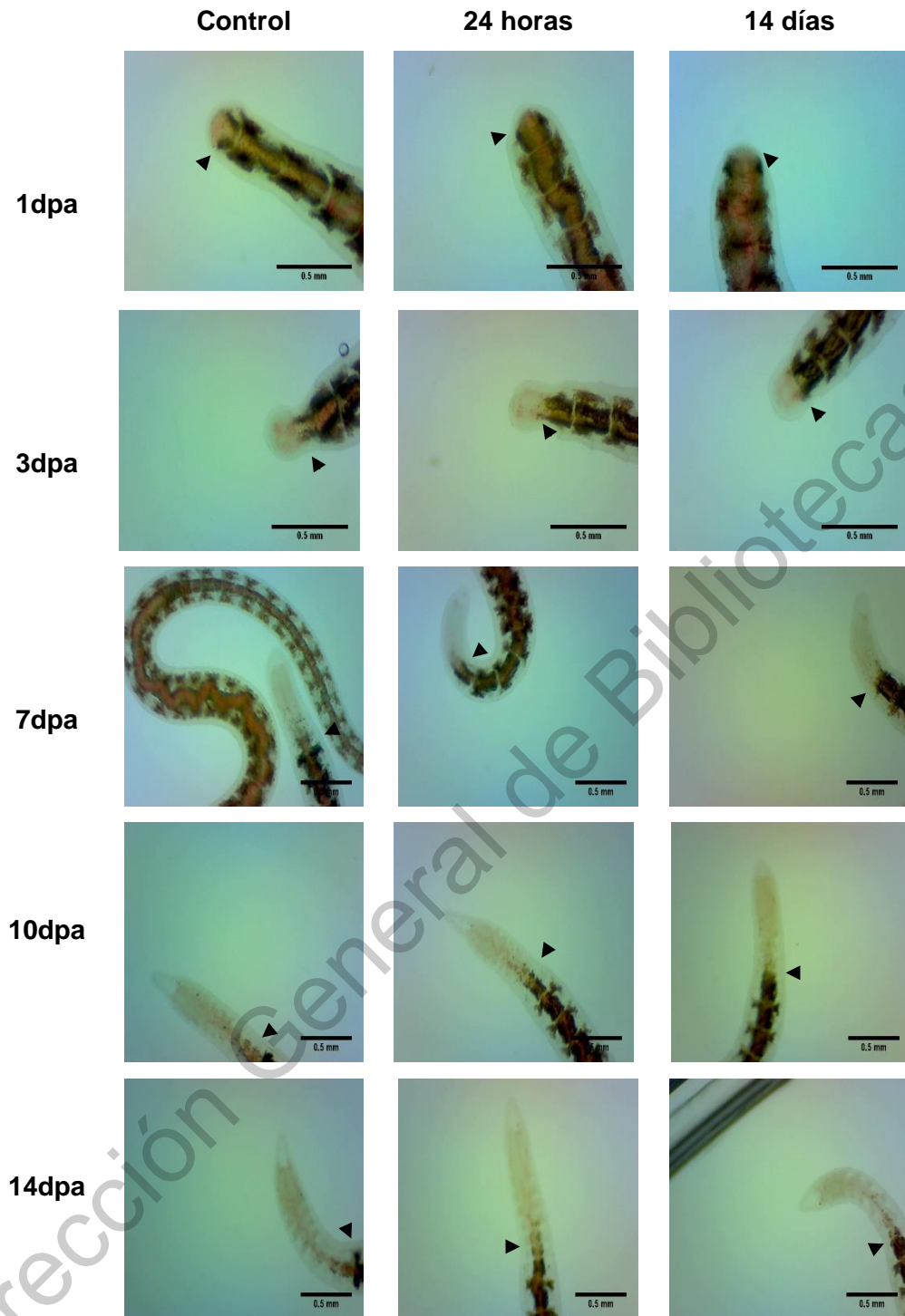


Figura 22. Efecto de la administración de 100 μM 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior de *Lumbriculus variegatus*. Se seleccionaron oligoquetos adultos a los cuales se les realizó un corte medial. Se colocaron tres grupos: al control se le administró diariamente 0.045% de DMSO, al grupo dos se administró aza-2'-desoxicitidina durante 24 horas, posterior a este periodo únicamente se le incorporó DMSO a la misma concentración que el grupo control. Al tercer grupo se le administró el tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina durante todo el experimento. Las placas se incubaron a 20°C durante todo el experimento. La tasa de regeneración se determinó del día uno al dos, del 5 al 9 y del 12 al 14. Las flechas indican el punto de corte. Escala (0.5 mm). n=7.

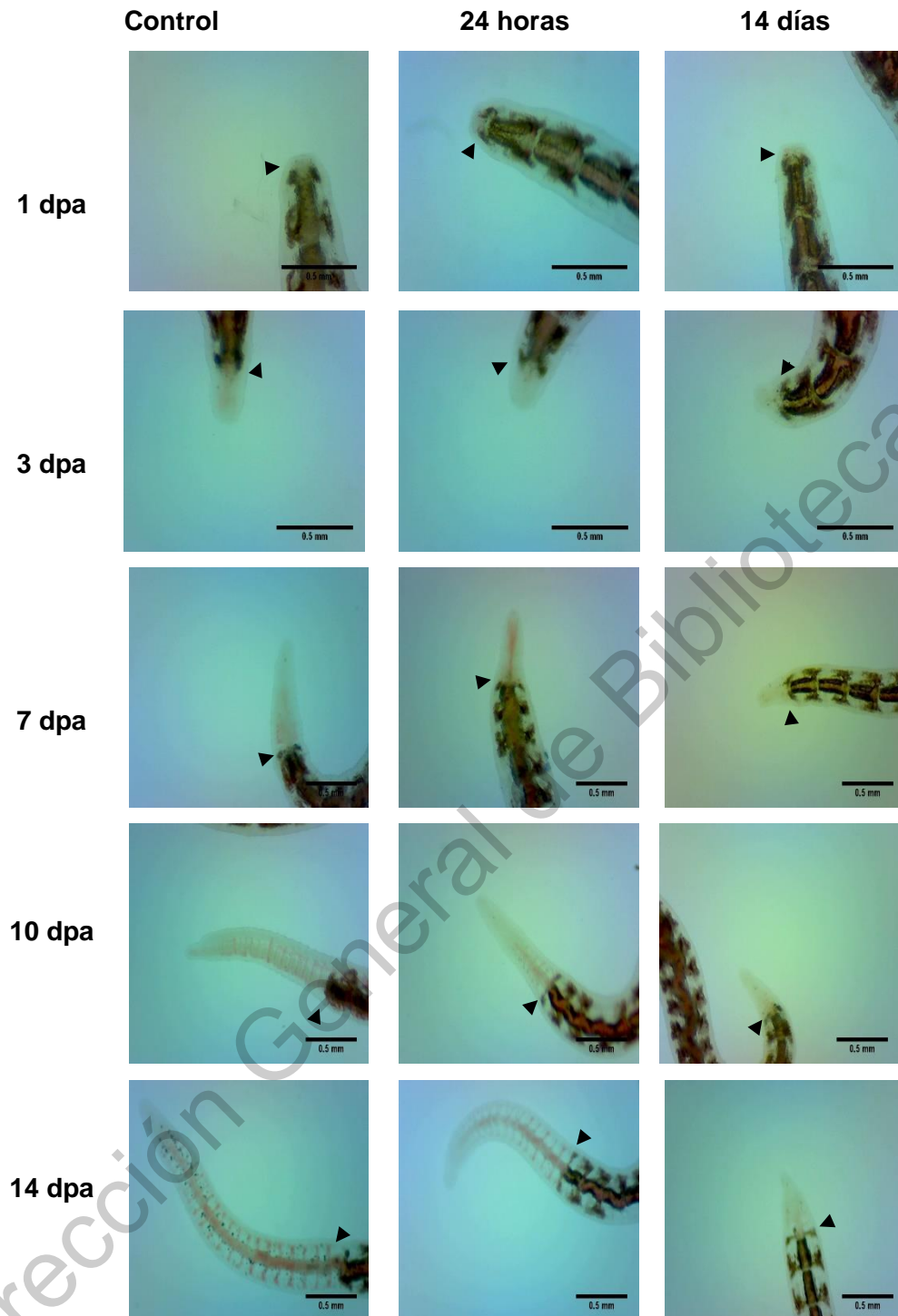


Figura 23. Efecto de la administración de 100 μM 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración posterior de *Lumbriculus variegatus*. Se seleccionaron oligoquetos adultos a los cuales se les realizó un corte medial. Se colocaron tres grupos: al control se le administró diariamente 0.045% de DMSO, al grupo dos se administró aza-2'-desoxicitidina durante 24 horas, posterior a este periodo únicamente se le incorporó DMSO a la misma concentración que el grupo control. Al tercer grupo se le administro el tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina durante todo el experimento. Las placas se incubaron a 20°C durante todo el experimento. La tasa de regeneración se determinó del día uno al dos, del 5 al 9 y del 12 al 14. Las flechas indican el punto de corte. Escala (0.5 mm). n=7

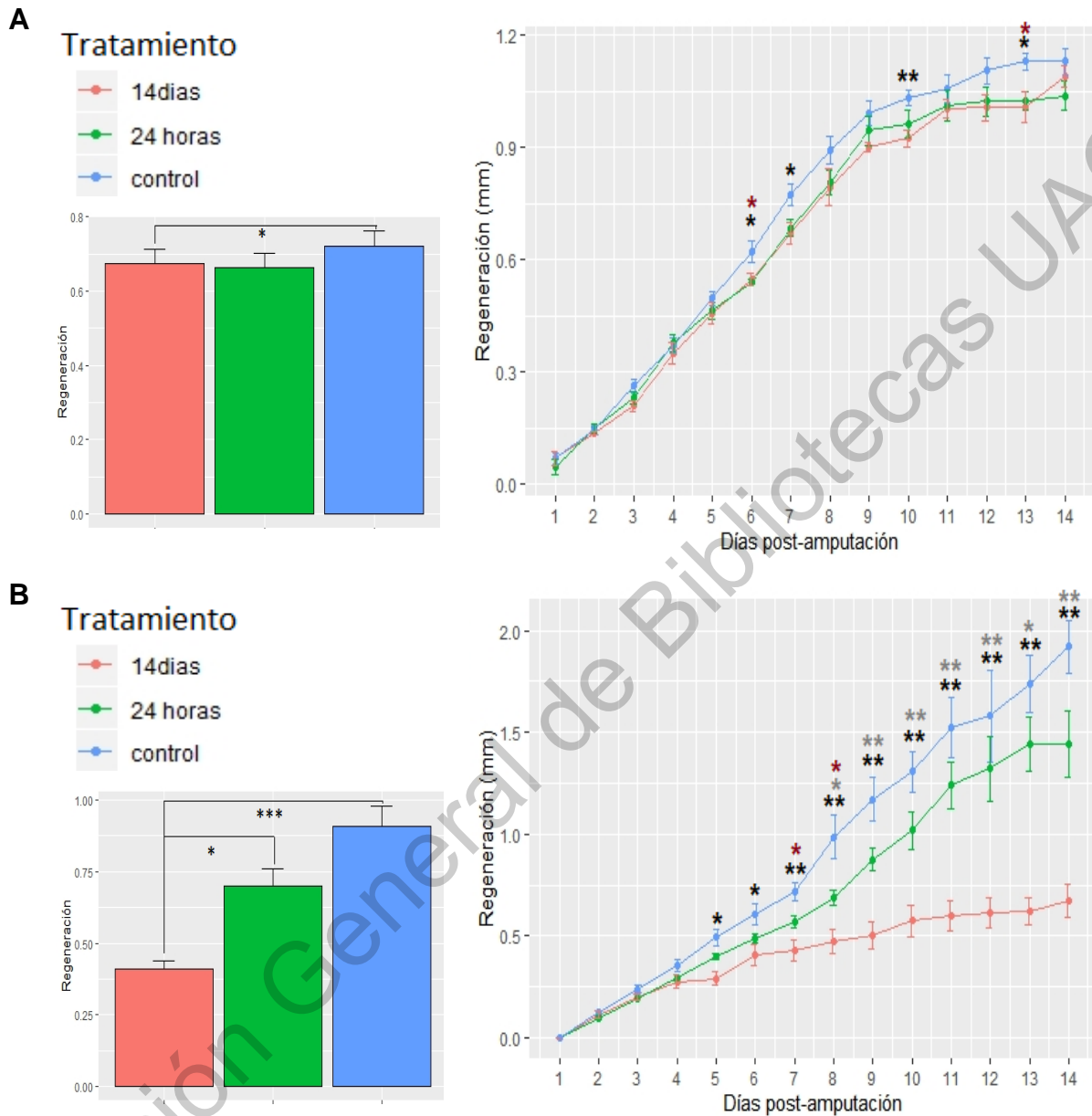


Figura 24. Efecto de la administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de *Lumbriculus variegatus* La tasa de regeneración se determinó durante 14 días consecutivos. A) Regeneración anterior y B) regeneración posterior. Los datos se compraron con un ANOVA de medidas repetidas y la significancia entre días se determinó con una prueba de Kruskal-Wallis. P (<0.05*, <0.01**, <0.001***). Diferencias: * control-14 días, * control-24 horas, * 14 días-24 horas. Barras de error estándar (SE) n=6 para cada grupo.

Resultados RM-ANOVA			
	gl	f	p
Extremidad anterior	1	2.241	0.157
Extremidad posterior	1	21.975	0.001

Tabla 11. Resultados del RM-ANOVA, bioensayo de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina

A) Resultados anteriores				B) Resultados posteriores			
Día	chi-squared	df	p-value	Día	chi-squared	df	p-value
Día 1	0.0067019	1	0.9348	Día 1	0.4397	1	0.4397
Día 2	0.17299	1	0.6775	Día 2	2.2857	1	0.1306
Día 3	0.051429	1	0.8206	Día 3	4.8057	1	0.02837
Día 4	1.8514	1	0.1736	Día 4	2.2857	1	0.1306
Día 5	1.2023	1	0.2729	Día 5	4.8057	1	0.02837
Día 6	1.9572	1	0.1618	Día 6	5.2267	1	0.0224
Día 7	1.1277	1	0.28883	Día 7	2.52	1	0.1124
Día 8	1.2161	1	0.2701	Día 8	5.6067	1	0.01789
Día 9	2.6677	1	0.1025	Día 9	2.16	1	0.1416
Día 10	1.6394	1	0.2004	Día 10	2.8235	1	0.09289
Día 11	0.0019493	1	0.9648	Día 11	0.50526	1	0.4772
Día 12	0.23148	1	0.6304	Día 12	2.0211	1	0.1551
Día 13	2.2557	1	0.1331	Día 13	1.7763	1	0.1826
Día 14	0.017562	1	0.8946	Día 14	4.864	1	0.02742

Tabla 12. Resultados del análisis por día, bioensayo de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina

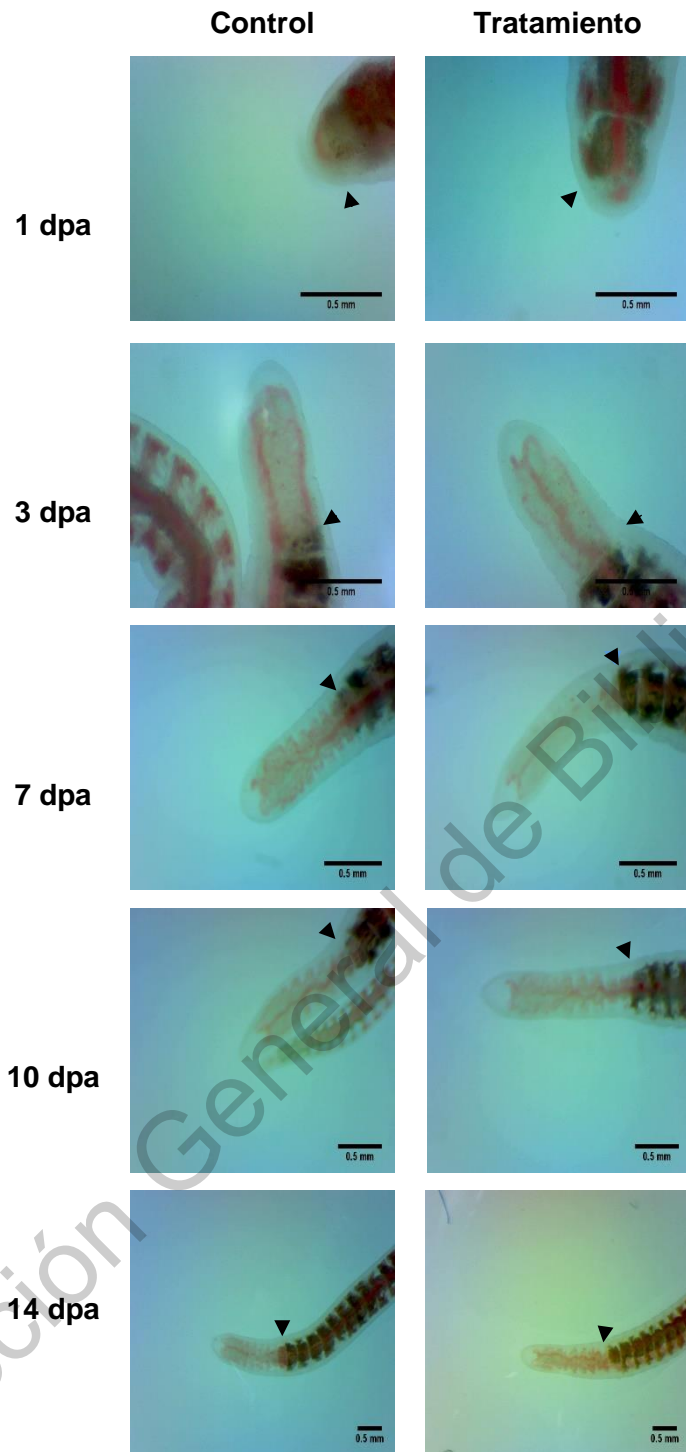


Figura 25. Efecto de la administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración anterior de *Lumbriculus variegatus* (número mínimo de muestra). Se seleccionaron oligoquetos adultos a los cuales se les realizó un corte medial. Se colocaron dos grupos: al control se le administró diariamente 0.045% de DMSO, al grupo experimental se le incorporó 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina 14 días consecutivos. Las placas se incubaron a 20°C durante todo el experimento. La tasa de regeneración se determinó durante todo el experimento. Las flechas indican el punto de corte. Escala (0.5 mm). n=10

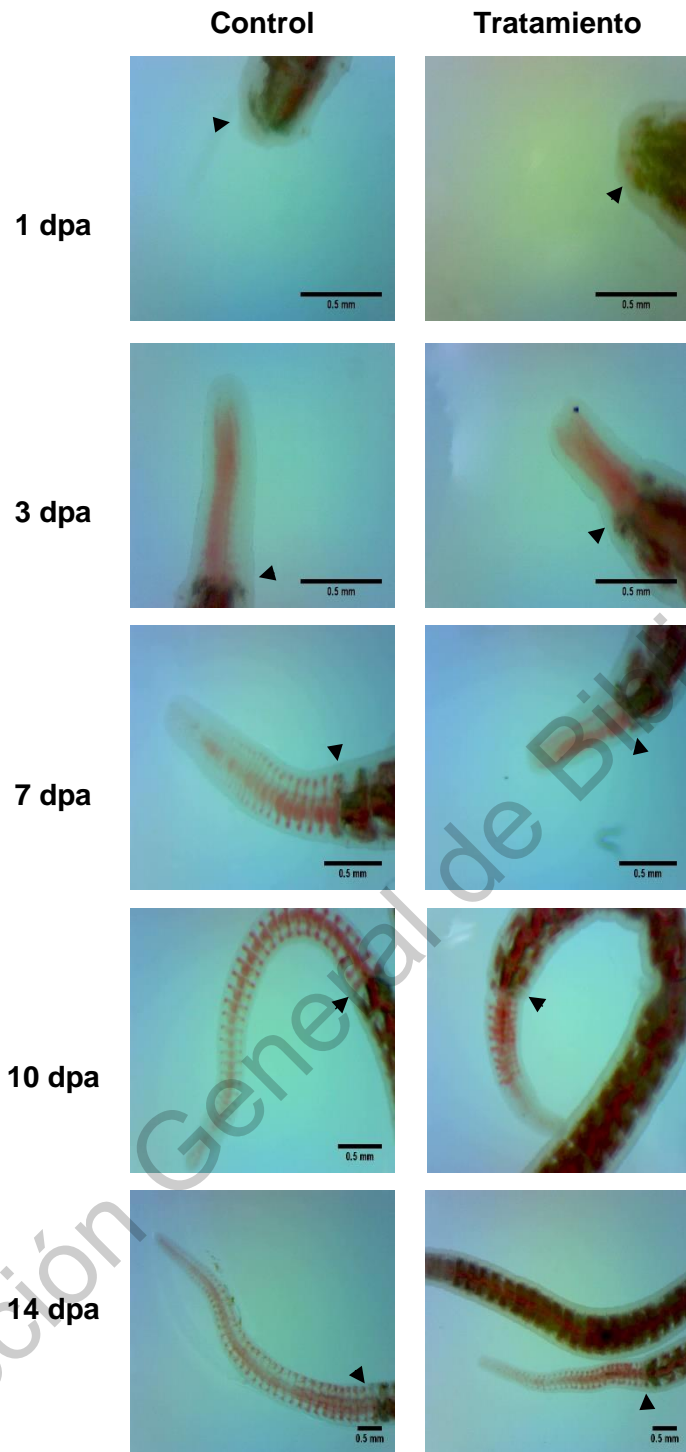


Figura 26. Efecto de la administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración posterior de *Lumbriculus variegatus* (número mínimo de muestra). Se seleccionaron oligoquetos adultos a los cuales se les realizó un corte medial. Se colocaron dos grupos: al control se le administró diariamente 0.045% de DMSO y al grupo experimental se le incorporó 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina 14 días consecutivos. Las placas se incubaron a 20°C durante todo el experimento. La tasa de regeneración se determinó durante todo el experimento. Las flechas indican el punto de corte. Escala (0.5 mm). n=10

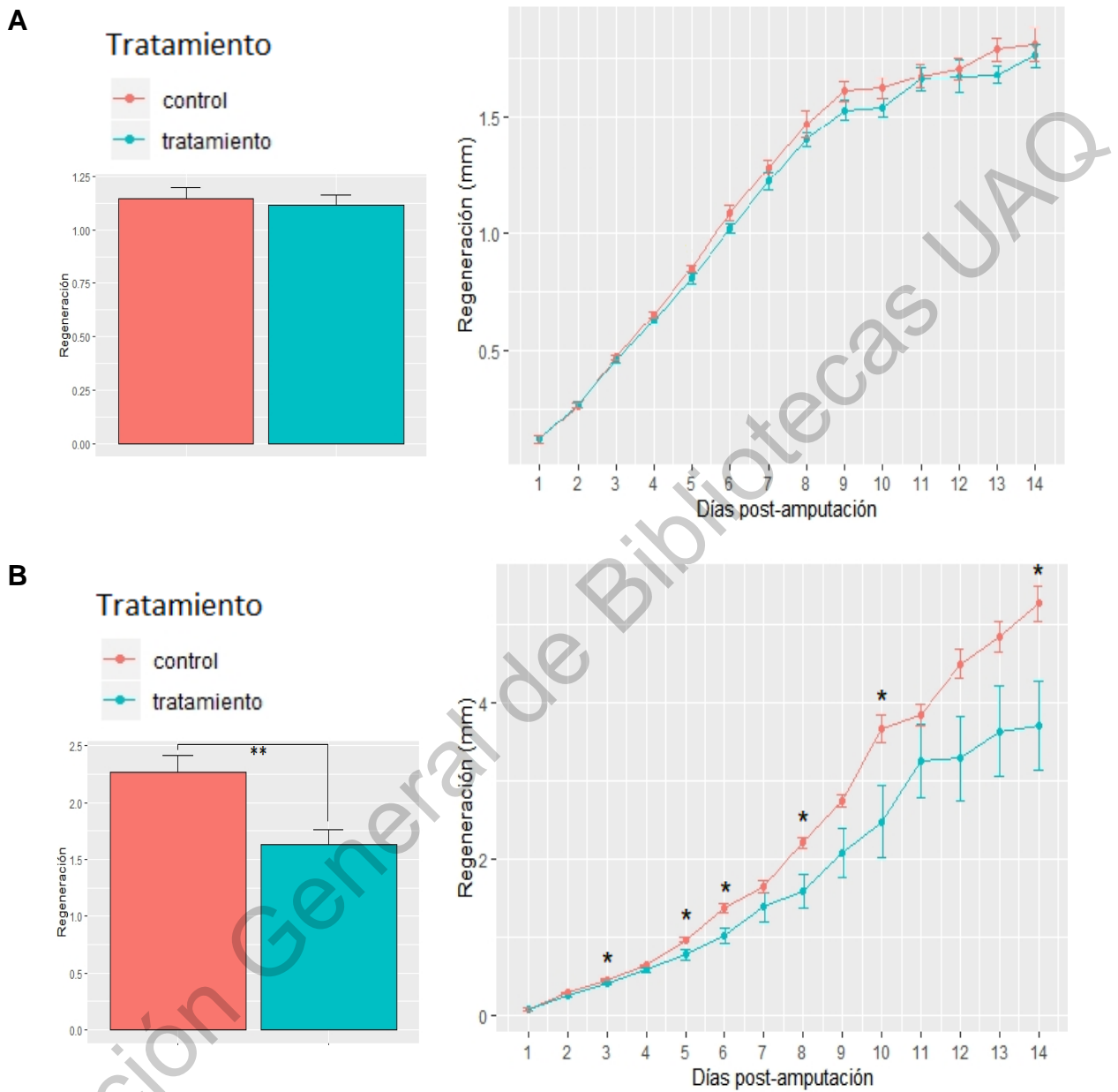


Figura 27. Efecto de la administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina en la regeneración de *Lumbriculus variegatus* (número mínimo de muestra). La tasa de regeneración se determinó durante 14 días consecutivos. A) Regeneración anterior, B) Regeneración posterior. Los datos se compararon con un RM-ANOVA y la significancia por entre días se determinó con una prueba de Kruskal-Wallis. Barras de error estándar (SE). P (<0.05*, <0.01, <0.001***). n=10 para cada grupo.**

7. Discusión

Esta tesis describió el proceso de regeneración de *Lumbriculus variegatus* durante los primeros 14 días post-amputación. El proceso de regeneración en anélidos suele clasificarse en cinco etapas principales: la cicatrización, formación del blastema, maduración del blastema, diferenciación y crecimiento (Özpolat y Bely, 2016). El primer evento, involucra dos procesos importantes (1) la contracción muscular y (2) la formación de la capa epidérmica apical. En este modelo, la contracción muscular de los segmentos adyacentes a la zona de la herida es un evento sumamente rápido, se logró determinar durante los primeros minutos posteriores a la amputación. Posteriormente, se observó fusión de los tejidos adyacentes de la zona de la herida, no se determinó fisión en esta región como en otras especies (Bely, 2014). La formación de la capa epidérmica apical se determinó aproximadamente entre la hora 10 y la 12 hpa. El segundo evento, la formación del blastema, se logró determinar en algunos individuos entre las 12 y las 18 hpa. A la hora 18 todos los oligoquetos presentaban blastema tanto en la región anterior como en la región posterior. El blastema no presentó características morfológicamente distintas entre extremidades durante las primeras horas; sin embargo, el blastema de la región posterior suele presentarse en menor proporción a comparación del anterior durante las primeras 24 horas. La maduración del blastema se observó durante los primeros 2 dpa, este incrementa de tamaño con el tiempo en ambas extremidades. Un aspecto importante por mencionar es que desde la hora 24 se logró observar migración de células pigmentarias al blastema, este evento se presentó en mayor proporción en la región anterior que en la posterior, y este evento continuó hasta días posteriores (datos no mostrados). La migración de pigmentos (células diferenciadas) no se ha descrito en este modelo; sin embargo, sí se ha observado la migración celular en el estudio de (Tweeten y Anderson, 2008). El análisis de estas células pigmentarias podría proporcionar información importante sobre el proceso de regeneración en esta especie.

Con base en los resultados, en los ensayos con AF se determinó que este compuesto favorece la regeneración anterior y posterior solo en algunos días posteriores a la amputación cuando se administró a la concentración de 0.1 mg/ml y no tuvo efecto a la concentración de 0.05 mg/ml. Un aspecto importante por mencionar es que la significancia se determinó dentro de los primeros 7 dpa y posterior a este lapso se perdió la significancia. Existen varias posibles explicaciones para este resultado, si analizamos los eventos que ocurren durante los primeros 7 dpa, podemos encontrar que se lleva a cabo la formación y maduración del blastema y la diferenciación entre extremidades. La primera podría ser porque el ácido fólico participa en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Crider et al., 2012) por lo que la administración de este compuesto podría favorecer de este modo la regeneración. En adición, el AF se ha relacionado en múltiples estudios porque propicia la adecuada formación del sistema nervioso central (Balashova et al., 2018). No se ha reportado en *Lumbriculus variegatus* cuál es el intervalo de tiempo de regeneración del sistema nervioso; sin embargo, en otras especies de anélidos se ha descrito que este se empieza a desarrollar desde los primeros días (Bely, 2014; Özpölat y Bely, 2016).

Por otra parte, el AF es un importante donador de grupos metilo para eventos de metilación, los resultados obtenidos podrían correlacionarse con eventos epigenéticos. En el estudio de Iskandar y col (2010), determinaron regeneración axonal mediada por folato, esto dependía de la expresión de genes *Folr1* posterior a la lesión. Por otra parte, determinaron que los efectos del folato dependía de la dosis y lo correlacionaron con eventos de metilación y expresión de *DNMT de novo* (Iskandar et al., 2010). De igual manera se ha determinado que el AF favorece la diferenciación de células madre neurales y la actividad de las *DNMT*, por lo que lo han atribuido a procesos de metilación (Luo et al., 2013)

Por otra parte, los resultados obtenidos de la administración del inhibidor de metiltransferasas, 5-aza-2'-desoxicitidina, mostraron una disminución en la regeneración. Se evaluó en primer instancia, cuál era el efecto de administrar este fármaco 24 horas previas a la amputación. Los resultados, indicaron que no altera

la regeneración en los días posteriores. La respuesta fue casi similar que la del grupo control. Este resultado podría explicarse ya que este fármaco necesita que las células se encuentren en la fase S del ciclo celular para poder ser incorporado en el genoma y así poder generar el complejo con las metiltransferasas para posteriormente ser llevada a degradación y así causar desmetilación gradual (Gros et al., 2012) . Sería interesante probar el efecto de este fármaco durante la fisión, ya que en otras especies de anélidos se ha reportado expresión génica durante etapas tardías de este proceso (Bely y Wray, 2001) y se ha determinado proliferación celular en la zona de fisión en *Pristinia leidyi* (Zattara y Bely, 2013).

También se exploró cual era el efecto de la administración del inhibidor únicamente en las primeras 24 hpa. Los resultados indicaron una menor tendencia en la regeneración únicamente en algunos días tanto en la región anterior como en la posterior. Si analizamos el proceso de regeneración durante las primeras 24 horas, el primer evento es detener el sangrado por medio de la contracción de los segmentos periféricos a la zona de la herida (Bely, 2014) , este evento pudo notarse en la primera hora de regeneración en esta especie. El segundo evento, es la formación de la capa epidérmica apical. Posteriormente, el tejido adyacente en esta zona se desdiferencia para dar pauta a la formación del blastema, en otras especies se ha reportado este evento entre 24 hpa a 36 hpa (Bely, 2014; Özpölat y Bely, 2016); en este trabajo se observó cerca de la hora 12-18. El blastema es un cúmulo de células desdiferenciadas donde se presenta una alta tasa de proliferación (Reddien y Alvarado, 2004). Por lo que se podría pensar, que el fármaco es incorporado aproximadamente posterior a la hora 12 dentro del ADN por lo que solo tendría un tiempo muy corto de exposición.

Se evaluó el efecto de la exposición con decitabina durante 14 días consecutivos a 30 μM y 100 μM . Para fines de claridad, primero se discutirán los resultados de la regeneración de la extremidad anterior. A la concentración 30 μM no se encontraron diferencias entre grupos. Se repitió el experimento aumentando la concentración a 100 μM . Respecto a resultados obtenidos del bioensayo con 5 réplicas, se logró observar diferencia significativa solo en algunos días después de 5 dpa. Esta

disminución en la regeneración no se vio tan marcada a comparación de la extremidad posterior; si analizamos este resultados podría explicarse ya que la región anterior solo puede recuperar 8 segmentos a diferencia de la región posterior donde se incorporan un mayor número de segmentos (Drewes y Fourtner, 1990; Martínez et al., 2005).

Respecto a la extremidad posterior, se determinaron diferencias significativas en el día 7, 12 y 13 a la concentración de 30 μM . Por otro lado, en bioensayo con 100 μM se observaron diferencias desde el día 5 hasta el final del experimento. Respecto al bioensayo con el tamaño mínimo de muestra se determinó diferencia significativa posterior al 3 dpa. En este trabajo no se determinó el número de segmentos al final de cada experimento, esto debido a que en la zona de crecimiento estos eran muy pequeños y no se lograron apreciar en las imágenes obtenidos en los bioensayos. Sin embargo, si analizamos los segmentos visibles en las imágenes de los bioensayos se observa que el grupo al que se le administró el fármaco durante 14 días presenta menor número de segmentos y que aquellos proximales al tejido antiguo presentan una menor proporción a comparación de los observados del grupo control, así como que en algunas imágenes no se logra apreciar definidos los segmentos. Por lo que nos hace pensar que el efecto del inhibidor podría tener un efecto importante en la generación de nuevos segmentos y posiblemente en la diferenciación.

A comparación con el genoma de los vertebrados, los invertebrados presentan niveles más bajos de metilación y estas marcas suelen presentar una distribución tipo mosaico con algunas zonas altamente metiladas (Suzuki y Bird, 2008; Zemach et al., 2010). Se ha confirmado que estas marcas están se asocian mayoritariamente a regiones codificantes aunque también pueden encontrarse en regiones no codificantes (Suzuki y Bird, 2008). En invertebrados se han asociado estas marcas epigenéticas con activación transcripcional (Suzuki y Bird, 2008; Zemach et al., 2010; Sarda et al., 2012) y también al empalme alternativo (Terrapon et al., 2014; Arsenault et al., 2018).

Existe muy poca evidencia del papel de las metilaciones dentro del filo de los anélidos. El primer reporte de metilación dentro de este grupo fue en 1997 en *Chaetopterus variopedates*, aquí determinaron metilaciones en sitios CpG y el porcentaje de metilación en adultos, embriones y células espermáticas y determinaron que el porcentaje de metilación disminuía en adultos (del Gaudio et al., 1997). También se han asociado estas marcas con la respuesta a estímulos ambientales en el poliqueto antártico *S. tcherniani* y en *P. cornuta* (Marsh y Pasqualone, 2014; MacDonald G, 2017). Recientemente se ha reportado la presencia de la enzima DNMT1 y DNMT2 en *P. elegans* en un estudio donde analizaron patrones de metilación de hembras grávidas que producen diferentes polimorfismos en larvas (Kesäniemi et al., 2016). Con las evidencias anteriores, este trabajo es una aproximación del efecto que podrían tener las metilaciones durante la regeneración de *Lumbriculus variegatus*.

8. Conclusiones

- La administración con 0.05 mg/ml de AF no mostró diferencias significativas sobre la regeneración de *L. variegatus*.
- La administración de 0.01 mg/ml de AF favoreció la regeneración anterior y posterior algunos días durante las primeras etapas de la regeneración. Este efecto podría relacionarse con el desarrollo del sistema nervioso.
- La administración de los inhibidores genera cambios significativos en la regeneración cuando se incorpora posterior a la amputación.
- La administración de 30 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina afecta únicamente la regeneración posterior en algunos días.
- La administración de 100 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina disminuye la regeneración, con efecto más marcado en la región posterior.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

9. Referencias

Agrawal, K., V. Das, P. Vyas, and M. Hajdúch. 2018. Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs – A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacology & Therapeutics*. 188:45–79. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.006.

Arsenault, S. V., B. G. Hunt, and S. M. Rehan. 2018. The effect of maternal care on gene expression and DNA methylation in a subsocial bee. *Nat Commun*. 9:1–9. doi:10.1038/s41467-018-05903-0.

Balashova, O. A., O. Visina, and L. N. Borodinsky. 2018. Folate action in nervous system development and disease. *Dev Neurobiol*. 78:391–402. doi:10.1002/dneu.22579.

Bely, A. E. 2014. Early events in annelid regeneration: a cellular perspective. *Integr. Comp. Biol*. 54:688–699. doi:10.1093/icb/icu109.

Bely, A. E., and G. A. Wray. 2001. Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed- and orthodenticle-class gene expression. *Development*. 128:2781–2791.

Bhambri, A., N. Dhaunta, S. S. Patel, M. Hardikar, A. Bhatt, N. Srikakulam, S. Shridhar, S. Vellarikkal, R. Pandey, R. Jayarajan, A. Verma, V. Kumar, P. Gautam, Y. Khanna, J. A. Khan, B. Fromm, K. J. Peterson, V. Scaria, S. Sivasubbu, and B. Pillai. 2018. Large scale changes in the transcriptome of *Eisenia fetida* during regeneration. *PLOS ONE*. 13:e0204234. doi:10.1371/journal.pone.0204234.

Bleidorn, C., C. Helm, A. Weigert, and M. T. Aguado. 2015. Annelida. In: p. 193–230.

Brinkhurst, R. O., and S. Gelder R. 1991. Annelida: Oligochaeta and Branchiobdellida. In: Thorp TH and Covich AP (eds), *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press. New York, NY, USA.

Brito, A., E. Hertrampf, M. Olivares, D. Gaitán, H. Sánchez, L. H. Allen, and R. Uauy. 2012. Folatos y vitamina B12 en la salud humana. *Revista médica de Chile*. 140:1464–1475. doi:10.4067/S0034-98872012001100014.

C. Drewes. 2002. Functional organization of the nervous system in *Lumbriculus variegatus*. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Functional-organization-of-the-nervous-system-in-Drewes/5eb89d66ce8e0a2eb959d0c8216ea5bc649dd83d>

Cornec, J.-P., J. Cresp, P. Delye, F. Hoarau, and G. Reynaud. 1987. Tissue responses and organogenesis during regeneration in the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* (Clap.). *Can. J. Zool*. 65:403–414. doi:10.1139/z87-061.

Crider, K. S., T. P. Yang, R. J. Berry, and L. B. Bailey. 2012. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Adv Nutr.* 3:21–38. doi:10.3945/an.111.000992.

Dean, H. K. 2008. The use of polychaetes (Annelida) as indicator species of marine pollution: a review. *Revista de Biología Tropical.* 56:11–38.

Deans, C., and K. A. Maggert. 2015. What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics.* 199:887–896. doi:10.1534/genetics.114.173492.

Drewes, C. D. 1996. Heads or Tails? Patterns of segmental regeneration in a freshwater oligochaete. Association for Biology Laboratory Education (ABLE). 17 in *Tested Studies for Laboratory Teaching*:23–35.

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

Drewes, C. D., and C. R. Fournier. 1990. Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganization of escape reflexes in regenerating body fragments. *Developmental Biology.* 138:94–103. doi:https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90179-M.

Drewes, C. D., and Fournier, C. R. 1991. Reorganization of escape reflexes during asexual fission in an aquatic oligochaete, *Dero digitata*. *J. Exp. Zool.* 170–180. doi:10.1002/jez.1402600206.

Elliott, S. A., and A. Sánchez Alvarado. 2013. The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2:301–326. doi:10.1002/wdev.82.

Fauchald Kristian. 1977. The polychaete worms. Definitions and keys to the orders, families and genera. Science series. Science series, Natural History Museum of Los Angeles County.

Gardiner-Garden, M., and M. Frommer. 1987. CpG Islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology.* 196:261–282. doi:10.1016/0022-2836(87)90689-9.

del Gaudio, R., R. Di Giaimo, and G. Geraci. 1997. Genome methylation of the marine annelid worm *Chaetopterus variopedatus*: methylation of a CpG in an expressed H1 histone gene. *FEBS Lett.* 417:48–52. doi:10.1016/s0014-5793(97)01262-3.

Gilbert SF. 2000. *Developmental Biology.* 6th edition. Sinauer Associates, Sunderland (MA). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9971/>

Gros, C., J. Fahy, L. Halby, I. Dufau, A. Erdmann, J.-M. Gregoire, F. Ausseil, S. Vispé, and P. B. Arimondo. 2012. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie*. 94:2280–2296. doi:10.1016/j.biochi.2012.07.025.

Hermann, A., R. Goyal, and A. Jeltsch. 2004. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* 279:48350–48359. doi:10.1074/jbc.M403427200.

Iskandar, B. J., E. Rizk, B. Meier, N. Hariharan, T. Bottiglieri, R. H. Finnell, D. F. Jarrard, R. V. Banerjee, J. H. P. Skene, A. Nelson, N. Patel, C. Gherasim, K. Simon, T. D. Cook, and K. J. Hogan. 2010. Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J Clin Invest*. 120:1603–1616. doi:10.1172/JCI40000.

Jin, Z., and Y. Liu. 2018. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis*. 5:1–8. doi:10.1016/j.gendis.2018.01.002.

Jones, P. A., and S. M. Taylor. 1980. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 20:85–93. doi:10.1016/0092-8674(80)90237-8.

Kesäniemi, J. E., L. Heikkinen, and K. E. Knott. 2016. DNA Methylation and Potential for Epigenetic Regulation in *Pygospio elegans*. *PLoS One*. 11. doi:10.1371/journal.pone.0151863. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4805255/>

Kozin, V. V., and R. P. Kostyuchenko. 2015. Vasa, PL10, and Piwi gene expression during caudal regeneration of the polychaete annelid *Alitta virens*. *Dev. Genes Evol*. 225:129–138. doi:10.1007/s00427-015-0496-1.

Lesiuk, N. M., and C. D. Drewes. 1999. Autotomy reflex in a freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus* (Clitellata: Lumbriculidae). *Hydrobiologia*. 406:253–261. doi:10.1023/A:1003756722019.

Lister, R., M. Pelizzola, R. H. Downen, R. D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J. R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q.-M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A. H. Millar, J. A. Thomson, B. Ren, and J. R. Ecker. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 462:315–322. doi:10.1038/nature08514.

Lopez, M., L. Halby, and P. B. Arimondo. 2016. DNA Methyltransferase Inhibitors: Development and Applications. *Adv. Exp. Med. Biol*. 945:431–473. doi:10.1007/978-3-319-43624-1_16.

Luo, S., X. Zhang, M. Yu, H. Yan, H. Liu, J. X. Wilson, and G. Huang. 2013. Folic acid acts through DNA methyltransferases to induce the differentiation of neural stem cells into neurons. *Cell Biochem. Biophys*. 66:559–566. doi:10.1007/s12013-012-9503-6.

MacDonald G. 2017. Environmental factors affect DNA methylation in the marine polychaete *Polydora cornuta* (Annelida). Acadia University. Available from: <https://scholar.acadiau.ca/islandora/object/theses:2119>

Marsh, A. G., and A. A. Pasqualone. 2014. DNA methylation and temperature stress in an Antarctic polychaete, *Spiophanes tcherniai*. *Frontiers in Physiology*. 5:173. doi:10.3389/fphys.2014.00173.

Martinez, V. G., J. M. B. Manson, and M. J. Zoran. 2008. Effects of Nerve Injury and Segmental Regeneration on the Cellular Correlates of Neural Morphallaxis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 310:520–533. doi:10.1002/jez.b.21224.

Martinez, V. G., G. J. Menger, and M. J. Zoran. 2005. Regeneration and asexual reproduction share common molecular changes: upregulation of a neural glycoepitope during morphallaxis in *Lumbriculus*. *Mechanisms of Development*. 122:721–732. doi:10.1016/j.mod.2004.12.003.

Moore, L. D., T. Le, and G. Fan. 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 38:23–38. doi:10.1038/npp.2012.112.

Morgan, T. H. 1901. *Regeneration*. Wilhelm Engelmann.

Myohara, M., C. C. Niva, and J. M. Lee. 2006. Molecular approach to annelid regeneration: cDNA subtraction cloning reveals various novel genes that are upregulated during the large-scale regeneration of the oligochaete, *Enchytraeus japonensis*. *Developmental Dynamics*. 235:2051–2070. doi:10.1002/dvdy.20849.

Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 99:247–257. doi:10.1016/s0092-8674(00)81656-6.

Özpolat, B. D., and A. E. Bely. 2016. Developmental and molecular biology of annelid regeneration: a comparative review of recent studies. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 40:144–153. doi:10.1016/j.gde.2016.07.010.

Randolph, H. 1892. The regeneration of the tail in lumbriculus. *Journal of Morphology*. 7:317–344. doi:10.1002/jmor.1050070304.

Reddien, P. W., and A. S. Alvarado. 2004. Fundamentals of planarian regeneration. *Annual review of cell and developmental biology*. 20:725–757. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.095114.

Ryan, A. B., and N. L. Elwess. 2017. A New Approach in Examining the Influence of Drugs on Pulsation Rates in Blackworms (*Lumbriculus Variegatus*). *Bioscene: Journal of College Biology Teaching*. 43:38–43.

Sánchez Alvarado, A., and P. A. Tsonis. 2006. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat. Rev. Genet.* 7:873–884. doi:10.1038/nrg1923.

Sarda, S., J. Zeng, B. G. Hunt, and S. V. Yi. 2012. The evolution of invertebrate gene body methylation. *Mol. Biol. Evol.* 29:1907–1916. doi:10.1093/molbev/mss062.

Schneider CA, R. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods.* 671–675.

Smith, A. D., Y.-I. Kim, and H. Refsum. 2008. Is folic acid good for everyone? *Am J Clin Nutr.* 87:517–533. doi:10.1093/ajcn/87.3.517.

Sorm, F., A. Pískala, A. Cihák, and J. Veselý. 1964. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia.* 20:202–203. doi:10.1007/bf02135399.

Suetake, I., F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima, and S. Tajima. 2004. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J. Biol. Chem.* 279:27816–27823. doi:10.1074/jbc.M400181200.

Suzuki, M. M., and A. Bird. 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9:465–476. doi:10.1038/nrg2341.

Taylor, S. M., and P. A. Jones. 1979. Multiple new phenotypes induced in 10 T 1 2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell.* 17:771–779. doi:10.1016/0092-8674(79)90317-9.

Terrapon, N., C. Li, H. M. Robertson, L. Ji, X. Meng, W. Booth, Z. Chen, C. P. Childers, K. M. Glastad, K. Gokhale, J. Gowin, W. Gronenberg, R. A. Hermansen, H. Hu, B. G. Hunt, A. K. Huylmans, S. M. S. Khalil, R. D. Mitchell, M. C. Munoz-Torres, J. A. Mustard, H. Pan, J. T. Reese, M. E. Scharf, F. Sun, H. Vogel, J. Xiao, W. Yang, Zhikai Yang, Zuoquan Yang, J. Zhou, J. Zhu, C. S. Brent, C. G. Elisk, M. A. D. Goodisman, D. A. Liberles, R. M. Roe, E. L. Vargo, A. Vilcinskis, J. Wang, E. Bornberg-Bauer, J. Korb, G. Zhang, and J. Liebig. 2014. Molecular traces of alternative social organization in a termite genome. *Nat Commun.* 5:1–12. doi:10.1038/ncomms4636.

Tweeten, K. A., and A. N. Anderson. 2008. Analysis of cell proliferation and migration during regeneration in *Lumbriculus variegatus* (Clitellata: Lumbriculidae).

Walsh, C. P., J. R. Chaillet, and T. H. Bestor. 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.* 20:116–117. doi:10.1038/2413.

Wu, T. P., T. Wang, M. G. Seetin, Y. Lai, S. Zhu, K. Lin, Y. Liu, S. D. Byrum, S. G. Mackintosh, M. Zhong, A. Tackett, G. Wang, L. S. Hon, G. Fang, J. A. Swenberg, and A. Z. Xiao. 2016. DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature.* 532:329–333. doi:10.1038/nature17640.

Yan, H., R. Bonasio, D. F. Simola, J. Liebig, S. L. Berger, and D. Reinberg. 2015. DNA methylation in social insects: how epigenetics can control behavior and longevity. *Annu. Rev. Entomol.* 60:435–452. doi:10.1146/annurev-ento-010814-020803.

Yang, X., H. Han, D. D. De Carvalho, F. D. Lay, P. A. Jones, and G. Liang. 2014. Gene Body Methylation can alter Gene Expression and is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer Cell.* 26:577–590. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.028.

Yang, X., F. Lay, H. Han, and P. A. Jones. 2010. Targeting DNA Methylation for Epigenetic Therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 31:536–546. doi:10.1016/j.tips.2010.08.001.

Zahnow, C. A., M. Topper, M. Stone, T. Murray-Stewart, H. Li, S. B. Baylin, and R. A. Casero. 2016. Inhibitors of DNA Methylation, Histone Deacetylation, and Histone Demethylation: A Perfect Combination for Cancer Therapy. *Adv. Cancer Res.* 130:55–111. doi:10.1016/bs.acr.2016.01.007.

Zattara, E., and A. Bely. 2013. Investment Choices in Post-Embryonic Development: Quantifying Interactions Among Growth, Regeneration, and Asexual Reproduction in the Annelid *Pristina leidyi*. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution.* 320. doi:10.1002/jez.b.22523.

Zemach, A., I. E. McDaniel, P. Silva, and D. Zilberman. 2010. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science.* 328:916–919. doi:10.1126/science.1186366.

Zhang, N. 2015. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Animal Nutrition.* 1:144–151. doi:https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.09.002.

Zhao, R., N. Diop-Bove, M. Visentin, and I. D. Goldman. 2011. Mechanisms of Membrane Transport of Folates into Cells and Across Epithelia. *Annu Rev Nutr.* 31. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145133. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3885234/>