

Portada Externa de Tesis

Autor: Graciela Esmeralda Colunga
Ramírez

"Mecanismos genéticos que regulan
la regeneración en el pez teleosteo
Betta splendens"

2016



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Nombre de la tesis:

**"MECANISMOS GENÉTICOS QUE REGULAN LA
REGENERACIÓN EN EL PEZ TELEÓSTEO *BETTA
SPLENDENS*"**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciada en Microbiología

2016

Portada Interna de Tesis
Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología

“Mecanismos genéticos que regulan la regeneración en el pez teleósteo *Betta splendens*”

Tesis Individual

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

Presenta:

Graciela Esmeralda Colunga Ramírez

Dirigido por:

Fausto Arellano Carbajal

SINODALES

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Presidente

Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Secretario

Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Vocal

Firma

Dra. Claudia Patricia Ornelas García

Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Julio 2016
MÉXICO

Resumen

La regeneración epimórfica es el proceso que involucra la generación de una estructura llamada blastema, una masa proliferativa de células progenitoras pluripotentes capaces de diferenciarse en las células del tejido perdido o dañado. En los estudios de regeneración de peces el apéndice más estudiado es la aleta caudal en el pez modelo *Danio rerio*. En este proyecto se propone a *Betta splendens* como un modelo emergente para estudios de regeneración de la aleta caudal. *Betta* se caracteriza por presentar aleta caudal de gran tamaño, ideal para la manipulación y amputación. *B. splendens* pertenece a los peces teleósteos con capacidad regenerativa de las aletas, pero hasta la fecha no existe evidencia científica a nivel molecular y descriptiva que lo documente. En este proyecto se determinó el tiempo de regeneración de la aleta caudal tras ser amputada y la expresión genética del ligando Wnt10a. Anteriormente, se ha reportado que este ligando participa en la vía Wnt/ β -catenina que está involucrada en procesos de regeneración epimórfica. Se anestesió a *B. splendens* con 100 μ l/L de aceite de clavo y la aleta caudal se amputó dos veces, la primera marcada como el tiempo cero horas post-amputación (0 hpa) y un segundo corte a las 72 hpa. Del tejido obtenido se realizó PCR retrotranscriptasa reversa empleando cebadores degenerados para Wnt10a. Se registró el tiempo de regeneración de la aleta caudal con una cámara digital y la temperatura ambiente se registró todos los días. El área y rayos regenerados fueron medidos con el software IMAGEJ. Los resultados indican que a una temperatura promedio de 23°C la regeneración casi se completa a los 68 dpa. Se estandarizó la técnica de RT-PCR para Wnt10a, los resultados muestran una banda de 1,000 pb, las esperadas para este gen.

Palabras clave: Regeneración, Blastema, Teleósteos, *B. splendens*, Wnt y PCR retrotranscriptasa reversa.

Summary

The epimorphic regeneration is the process that involves the generation of a structure called blastema, a proliferative mass of pluripotent progenitor cells able to differentiate themselves in lost or harmed tissue cells. In the regeneration studies of fishes the most studied appendix is the caudal fin in the model *Danio rerio*. *Betta splendens*, is proposed like as an emergent model for caudal fin regeneration. *B. splendens* is characterized for the presence of a big caudal fin that is ideal for the manipulation and amputation. *B. splendens* is a teleosts fish with the capacity to regenerate its fins, but there is no scientific evidence at molecular and descriptive level documented. In this project, the regeneration time of the caudal fin after been amputated and the genetic expression of the ligand *Wnt10a* were determined. Previously, it has been reported that this ligand participates in the Wnt/ β -catenin pathway that is involved in epimorphic regenerative processes. *B. splendens* was anesthetized with 100 μ l/L of clove oil and the caudal fin was amputated twice, the first was marked as time zero hours post amputation (0 hpa) and a second one at 72 hpa. A reverse transcriptase PCR was done with the obtained tissue, employing degenerated primers for *Wnt10a*. The caudal fin regeneration time was registered using a digital camera and the water temperature was registered every day. The regenerated rays and area of the fin were measured using IMAGEJ software. The results show that the regeneration is almost completed at 68 dpa with an average temperature of 23°C. The RT-PCR for *Wnt10a* was standardized and the results showed a 1000 bp band, the one expected for this gene.

Keywords: Regeneration, Blastema, Teleost, *B. splendens*, Wnt and Reverse Transcriptase PCR.

Dedicatorias

A mis padres que son el cimiento de mi vida y educación.

A mis hermanos que son un ejemplo para mi formación profesional.

A Fausto Arellano por ser un guía vocacional y ejemplo de ser humano.

A Ramón Rodríguez, por ser un gran compañero, amigo y ser humano.

Agradecimientos

A mi familia, por el apoyo en mi educación y vida.

A mis padres porque fueron los autores principales para continuar con mis estudios.

A mis profesores por brindarme su conocimiento, especialmente al Dr. José Antonio Cervantes Chávez quien con su dedicación, paciencia y comprensión me guio por el camino de la ciencia y la investigación desde el inicio de mi carrera hasta ahora.

Al Dr. Fausto Arellano quien me permitió desarrollar este proyecto y por ser un gran ejemplo a seguir profesionalmente y como ser humano honesto y ejemplar.

A todas las personas que hicieron posible el desarrollo de mi tesis fundamentalmente a mis compañeros de laboratorio y carrera.

A mis amigos que fueron y serán un apoyo base en mi vida, especialmente a Marina Banuet por ser una gran compañera de estudios y muestra de estudiante.

A Ramón por ser un apoyo fundamental para la realización de esta tesis y por brindarme su amor, tiempo y paciencia.

Índice	
Resumen	ii
Summary	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos	v
Índice de figuras.....	viii
Índice de cuadros.....	x
Índice de siglas.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Tipos de regeneración.....	4
2.3 Teleósteos como modelo de regeneración epimórfica	4
2.4 Estructura de la aleta caudal de teleósteos.....	5
2.5 Modelo de regeneración de la aleta caudal de peces teleósteos	7
2.6 Vías moleculares implicadas en el proceso de regeneración.....	8
2.7 Vía Wnt.....	9
2.7.1 Secreción de los ligandos proteicos Wnt y activación de las vías de Wnt	10
2.7.2 Vía Wnt canónica.....	12
2.8 <i>Betta splendens</i> como potencial modelo en regeneración	15
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 Objetivo General	21
5.2 Objetivos Particulares	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1 Declaración ética.....	22

6.2 Mantenimiento de los animales	22
6.3 Preparación del anestésico.....	23
6.5 Cuantificación de la zona regenerada de la aleta caudal	24
6.6 Extracción de ARN por técnica de Trizol y Obtención de ADN complementario	25
6.7 Cebadores	26
6.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa (RT-PCR)	26
6.9 Electroforesis	26
6.10 Secuenciación y análisis.....	¡Error! Marcador no definido.
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Tiempo de anestesia y recuperación del eje de nado.....	27
7.2 Temperatura ambiente promedio de peceras.....	28
7.3 Tiempo de anestesia.....	¡Error! Marcador no definido.
7.4 Tiempo de regeneración de la aleta caudal	30
7.5 Área de regeneración de la aleta caudal	33
7.6 Expresión del ligando Wnt10a	36
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIÓN	44
10. BIBLIOGRAFÍA	46

Índice de figuras

- Figura 1. Esqueleto de la aleta caudal del pez teleósteo, *D. rerio*. A) aleta caudal se compone 16 a 18 segmentos llamados radios de las aletas óseas o lepidotrichia, la mayoría de las cuales están bifurcados en los extremos conectado por tejido blando (regiones no teñidas entre los huesos). Cada rayo está compuesto por un par de semirayos (1 micra). B) Aumento en la zona distal de los rayos de la aleta muestra una disminución gradual del nivel de calcificación hacia el margen de la aleta (100 micras). C) Puntas de la aleta compuestas por un cepillo de espículas llamados actinotrichia. D) Segmentos entre rayos. Tomado de: Pfefferli y Jaźwińska, 2015. 6
- Figura 2. Vía Wnt/ β -catenina (canónica). En ausencia del ligandos Wnt, B-catenina citoplasmática forma un complejo con Axin, APC, GKS3 y CK1, y es fosforilada por CK1 y posteriormente por GSK3. B- catenina fosforilada es reconocida por la ubiquitina ligada B-TrCP y la manda a degradación al proteosoma. En presencia de ligandos Wnt, este se une a receptor FZ y correceptores LPR5/6Se une DSH y se conduce a la fosforilación de LRP5/6 y reclutamiento de Axin, mediado la fosforilación de B- catenina y su degradación. Posteriormente viaja al núcleo y se une con TCF para la activación de genes blanco. 14
- Figura 3. Aletas caudales de *B. splendens* adulto. *B. splendens* está formado por 7 aletas. Un par de aletas pectoral, par de aletas pélvicas, una aleta anal, una dorsal y una caudal..... 16
- Figura 4. Representación de la pecera de alojamiento de los peces. Muestra la pecera dividida por un muro de vidrio más un muro de plástico azul para evitar la visibilidad entre peces. Los peces fueron nombrados de izquierda a derecha como Betta 1, Betta 2 y Betta 3. 22
- Figura 5. Esquema de las amputaciones de la aleta caudal de *B. splendens*. A las 0 hpa se fotografió y amputo la aleta caudal el tejido se recogió y se guardó en Trizol. Después se sometió a una segunda amputación y se recogió el tejido amputado y se guardó en Trizol, la aleta caudal se fotografió. El proceso de regeneración se continuó fotografiando hasta completarse..... 24

Figura 6. Cuantificación de la zona regenerada de la aleta caudal. Se usó IMAGEJ con la herramienta color threshold para obtener una mejor diferencia entre las zonas regeneradas y sin regenerar. Se midió al área de la zona regenerada (A) y el crecimiento de los rayos (B), marcados en amarillo..... 25

Figura 7. Temperatura ambiente promedio registrada en agua de la pecera. Los puntos azules muestran la temperatura promedio de la mañana y noche registrada en durante todo el proceso experimental. 29

Figura 8. El proceso de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens*. Transcurso en el tiempo durante el proceso de regeneración a una temperatura promedio de 23°C. Sin corte, se muestra una aleta caudal en su tamaño original antes de la amputación. A las 0hpa, se realizó el primer corte de la aleta caudal. 72 hpa, se realizó un segundo corte de la aleta caudal. 6dpa, no presenta crecimiento de la aleta caudal. En 18 dpa se aprecia una excrecencia regenerativa, con la presencia de formación de rayos y pigmentación, la flecha amarilla muestra un espacio entre los sitios regenerados. A las 26 dpa se aprecia una ganancia del área regenerada, presentando aun espacios vacíos ente las regiones regeneradas. A partir de las 33 dpa se presentan pigmentación y crecimiento de los espacios vacíos vistos anteriormente (flecha roja). A partir de los 42 dpa hasta los 56 dpa, se muestra la presencia del desarrollo de delgados rayos entre los espacios que estaban únicamente pigmentados anteriormente, flechas verdes. A partir del 62 dpa es imposible distinguir los la división entre rayos y áreas pigmentadas, debido a que el área regenerada gana una mayor pigmentación, resultando difícil distinguir el área que se ha regenerado durante todo el proceso. Escala 1 cm..... 32

Figura 9. Aleta Caudal de *B. splendens* en regeneración. Se observa la zona de regeneración con un a tono rojizo más tenue que el resto de la aleta y la formación de rayos, rayos delgados e interrayos. 32

Figura 10. Aleta Caudal de *B. splendens*. Se observa la zona de regeneración una capa blanca-transparente al final de la aleta y al final entre los rayos de la aleta. 32

Figure 11. Proceso regenerativo de la aleta caudal. A) Aleta caudal sin amputar, B) Aleta caudal amputada y C) Aleta caudal regenerada a los 68 dpa. Circulo amarillo: ángulo generado por el corte triangular de la aleta caudal..... 33

Figura 12. Área de regeneración de la aleta caudal en cm² en función del tiempo. La regeneración incrementa respecto al tiempo de forma no lineal. El incremento a partir del día 6 según el registro fotográfico se observa una aceleración de la regeneración con respecto al tiempo, con un crecimiento tipo exponencial..... 34

Figura 13. Área regenerada de cada muestra fotográfica. El día documentado con mayor crecimiento se presenta a los 33 dpa muestra el mayor crecimiento de la aleta caudal. Parte superior izquierda figura 7 del registro de las temperaturas durante todo el proceso experimental..... 35

Figura 14. Crecimiento d la longitud del rayo con respecto al tiempo de regeneración. Se muestra el crecimiento del rayo más notorio durante el proceso de regeneración (B), (A) muestra el rayo seleccionado para determinar la longitud de crecimiento de los rayos (rayo seleccionado dentro del círculo amarillo) y (c) muestras los días 62 dpa y 68 dpa donde ya no es posible detectar el rayo medido anteriormente. 36

Figure 15. Gel de electroforesis con los cebadores FBs1_Wnt10a y RBs2_Wnt10a a las 0 hpa y 72 hpa de la aleta caudal de *B. splendens*..... 37

Índice de cuadros

Cuadro 1. Temperatura ambiente de peceras posteriores a la amputación .. **¡Error! Marcador no definido.**

Índice de siglas

LFCs.....	Lepidotrichia-forming cells
AEC.....	Apical epidermal cap.
Hda.....	Horas posteriores a la amputación.
Dpa.....	Días posteriores a la amputación.
FGF.....	Fibroblast growth factor
TGF- β	Transforming growth factor beta
Fz.....	Frizzled
Wls.....	Wntless
CRD.....	Cysteine rich domain
TCF.....	Disheveled
LEF1.....	Lymphoid enhancer-binding factor 1
PCR.....	Polimerase Chain Reaction

1. INTRODUCCIÓN

La pérdida de un tejido, órgano o extremidad en un animal puede tener efectos fatales en su historia de vida, por ejemplo: la capacidad de movilidad o desplazamiento debido a la pérdida de una extremidad como las patas; pérdida de visión, ocasionada por daños irreparables en los ojos; o pérdida de nado, en peces por daño en las aletas. Para contrarrestar los efectos negativos o incluso mortales debido a la pérdida de alguna parte del cuerpo de algún animal, éstos han desarrollado mecanismos para compensar lesiones o pérdidas mediante dos mecanismos: la curación y/o la regeneración (Poss et al., 2003)

La curación, se caracteriza por la presencia de un proceso inflamatorio, de fibrosis y cicatrización permanente del área afectada por tejido conectivo rico en colágeno. Esta es primera respuesta general que se monta para evitar daños mayores, a su vez, sirve para evitar la infección por algún agente patógeno. Por otra parte, la regeneración, es el proceso por el cual un organismo restaura en forma, estructura, función y sin cicatriz partes del cuerpo que han sufrido algún tipo de daño o pérdida (Kawakami et al., 2006; Poss et al., 2003; Stoick-Cooper et al., 2006). Existen tres tipos de regeneración. Las descritas por Morgan la morfálaxis y la epimórfica (Morgan, 1900), y la descrita por Sánchez y Newmark, el modelo intercalar (Jiménez, 2009; Newmark y Sánchez, 1997).

La regeneración epimórfica es el principal mecanismo de regeneración reportado en organismos vertebrados. La epimorfosis se define como el proceso de regeneración que involucra la generación de una estructura llamada blastema (masa proliferativa de células progenitoras pluripotentes). El blastema se diferencia en células de la estructura pérdida lo que llevará a la restauración morfológica y funcional de la estructura afectada. La regeneración epimórfica se ha reportado en extremidades de vertebrados como las salamandras y los peces teleósteos (Kawakami et al., 2006; Poss et al., 2000a, 2003; Stoick-Cooper et al., 2006).

Se conoce que una gran cantidad de organismos invertebrados poseen la capacidad de regenerar la mayoría de sus órganos o incluso regenerar totalmente todo su cuerpo, en cambio, los mamíferos poseen la capacidad de regenerar solo algunas estructuras como: glóbulos rojos, hígado, hueso, musculo esquelético, piel o intestino (Stoick-Cooper et al., 2006). Por lo que la mayoría de la investigación se ha enfocado en las condiciones humanas como lesiones, pérdidas, el envejecimiento o enfermedades que afecten órganos o tejidos que no poseen la capacidad de regenerarse; así como; en la búsqueda y el estudio de organismos vertebrados modelo que poseen esta capacidad.

La capacidad de los vertebrados para regenerar es muy variable. La regeneración de tejidos en seres humanos puede ocurrir limitadamente en estructuras como la piel, los intestinos, el músculo esquelético, los huesos, dígitos, el hígado y la sangre. Sin embargo, otras especies de vertebrados tienen la extraordinaria capacidad para regenerar lo largo de toda su vida tejidos y órganos perdidos (Azevedo et al., 2012). Por ejemplo, los urodelos como las salamandras pueden regenerar extremidades amputadas en cualquier momento durante su historia de vida, mientras las ranas solo pueden regenerar extremidades durante las etapas larvales, pero pierden esta capacidad gradualmente durante su desarrollo. Uno de los modelos mayormente usados en el estudio de la regeneración de vertebrados son los peces teleósteos debido a que poseen la capacidad de regenerar órganos como el corazón, retina y la aleta caudal. Las investigaciones se centran en la aleta caudal por ser una estructura con pocos tipos celulares y al conservar la capacidad regenerativa de la aleta caudal, sirve como excelente modelo de adulto eficiente en regeneración (Stoick-Cooper et al., 2006).

Betta splendens es un pez teleósteo con potencial regenerativo, usado actualmente como modelo en procesos de comportamiento, pero no en regeneración. Las ventajas que posee este organismo en el área de la regeneración de la aleta caudal es que posee una aleta caudal grande en proporción con su cuerpo, la pigmentación de sus aletas y la distinción de rayos a simple vista facilita la observación durante el proceso de regeneración. Por otra parte, es un pez de fácil

acceso ya que es considerado como un animal de uso ornamental por lo que se puede encontrar en cualquier tienda de mascotas o acuarios, es de fácil mantenimiento al no necesitar de una bomba de oxígeno. Genéticamente posee un genoma de 625 megabases (Mb), pequeño en comparación con una gran cantidad de vertebrados y otros modelos vertebrados usados en regeneración.

Una de los principales áreas de investigación de la regeneración es la identificación de los procesos moleculares y de señalización en organismos modelo de vertebrados (Kawakami et al., 2006; Stoick-Cooper et al., 2006; Tal et al., 2010; Tsonis, 2000). Por lo que en este trabajo se enfocará hacia una de las vías más importantes y mayormente estudiadas en los procesos de regeneración de extremidades, la vía canónica de *Wnt*, por medio de la expresión de ligandos *Wnt* relacionados con la activación de esta vía durante el proceso de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens*.

En este estudio se observó que el proceso de regeneración tras la amputación de la aleta caudal casi se completó a los 68 dpa. A la par, se observó que elevaciones en las temperaturas tenían un efecto sobre la velocidad del área regenerativa y crecimiento del rayo. Se realizaron dos cortes, el primero sirvió como tiempo cero, donde la expresión de genes como *Wnt10a* permanece en niveles bajos, este ligando participa en procesos de regeneración epimórfica. Transcurridas las 72 hpa se volvió a amputar la misma zona con el fin de detectar la presencia de *Wnt10a*, que sirve como indicador de un proceso molecular y celular de regeneración. Las amplificaciones del gen *Wnt10a* fueron detectadas a las 0 hpa y 72 hpa por la presencia de bandas en electroforesis obtenidas de la PCR transcriptasa reversa

2. ANTECEDENTES

2.1 Tipos de regeneración

A principios del siglo XX, Thomas Hunt Morgan fue el primero en describir que existen diferentes tipos de regeneración, él las describió como regeneración tipo morfalaxis y epimórfica (Morgan, 1900). La morfalaxis implica un remodelado de los tejidos preexistentes que forman parte de los tejidos cercanos al área amputada, estos se transformarán en aquellos que se han perdido y posteriormente comenzará un proceso proliferativo por el cual se alcanza el tamaño original. Este mecanismo se ha encontrado en invertebrados como la hidra (Jiménez, 2009; Morgan, 1900).

En cambio, la regeneración epimórfica es el proceso de regeneración que involucra la generación de una estructura llamada blastema (masa proliferativa de células progenitoras pluripotentes) que se va a diferenciar en células del tejido logrando restaurar morfológicamente y funcionalmente estructuras dañadas o perdidas. Este mecanismo ha sido mayormente estudiado en salamandras y peces teleósteos (Kawakami et al., 2006; Poss et al., 2000a, 2003; Stoick-Cooper et al., 2006).

Un siglo después, Sánchez y Newmark, proponen que ambos mecanismos de regeneración pueden ocurrir simultáneamente. A este mecanismo combinado de regeneración epimórfica e intercalar se le nombra como modelo intercalar y se ha reportado en invertebrados como la planaria (Newmark y Sánchez, 1997).

2.3 Teleósteos como modelo de regeneración epimórfica

Los peces teleósteos, junto con los anfibios urodelos como: las salamandras y el ajolote representan los organismos modelo en regeneración en vertebrados por la sorprendente capacidad de regenerar diversos órganos o tejidos (Ninov y Yun, 2015; Pfefferli y Jaźwińska, 2015). El pez teleósteo usado como modelo en el área de la regeneración epimórfica por excelencia es pez cebra (*Danio rerio*). Se conoce que el pez cebra tiene la capacidad para regenerar una gran variedad de estructuras como la retina (Bernhardt et al., 1996), el nervio óptico (Becker y Becker, 2002), el corazón (Raya et al., 2004), el hígado (Sadler et al., 2007), la medula espinal

(Becker, 2004), las células ciliadas sensoriales (López-Schier y Hudspeth, 2006), las escamas (Bereiter-Hahn y Zylberberg, 1993) y las aletas (Azevedo et al., 2012; Poss et al., 2000a).

El pez cebra adulto posee cinco tipos de aletas, todas capaces de regenerar: aleta anal, caudal, dorsal, pectoral y pélvica (Poss et al., 2003). A pesar de que todas las aletas regeneran, la aleta caudal ha sido la estructura clave para comprender los procesos de regeneración, ya que su ubicación y manipulación es de fácil acceso para la amputación, de igual manera, esta acción no pone en peligro su supervivencia (Poss et al., 2003). Conjuntamente, posee una estructura con pocos tipos celulares y el tiempo de regeneración es de dos a cuatro semanas dependiendo de la temperatura del agua (Pfefferli y Jazwińska, 2015).

En general, los peces teleósteos tienen la capacidad de reparar una lesión epidérmica después de una infección o una pelea, pero también pueden regenerar completamente apéndices que comprenden tejidos diferentes. Además, los rayos de la aleta caudal pueden regenerar independientemente uno del otro, proporcionando unidades regenerativas autónomas y múltiples réplicas experimentales en el mismo apéndice (Nabrit, 1929) lo que resulta en la estructura anatómica más usada para estudios de regeneración. Las investigaciones de regeneración de la aleta caudal en peces teleósteos se han registrado en tilapia, peces de colores, trucha y pez cebra, entre otros (Akimenko et al., 2003).

2.4 Estructura de la aleta caudal de teleósteos

Las aletas de los peces teleósteos consisten en estructuras no muscularizadas de origen dérmico que directamente mineralizan como hueso. La aleta caudal está organizada de varios rayos óseos segmentados internos llamados, lepidotrichias que están interconectados por tejido blando llamado interrayo compuesto por células mesenquimales y por donde circulan los vasos sanguíneos, nervios, melanocitos y fibroblastos (regiones no teñidas entre los rayos, Figura 1). Cada rayo está compuesto de un par de semirayos cóncavos que constan de múltiples segmentos unidos de extremo a extremo por ligamentos. Cada semirayo está cubierto por una capa de células óseas secretoras de matriz ósea conocidas

como escleroblastos, osteoblastos o células formadoras de lepidotrichia (LFCs, por sus siglas en inglés) (Azevedo et al., 2012; Huang et al., 2003; Pfefferli y Jaźwińska, 2015). Los rayos al igual que los interrayos también se encuentran innervados y vascularizados por arterias centrales (Pfefferli y Jaźwińska, 2015). En conjunto, la aleta más los rayos está encerrada en tejido epidermal (Akimenko et al., 1995; Bereiter-Hahn y Zylberberg, 1993; Lindsay, 2010). Al final de la aleta caudal, en la punta distal, la aleta está compuesta por espículas fusiformes no calcificadas en forma de cepillo llamadas actinotrichia, compuestas de colágeno. Las actinotrichia proporcionan soporte y flexibilidad a la aleta caudal (Akimenko et al., 2003; Durán et al., 2011; Santamaria y Becerra, 1991).

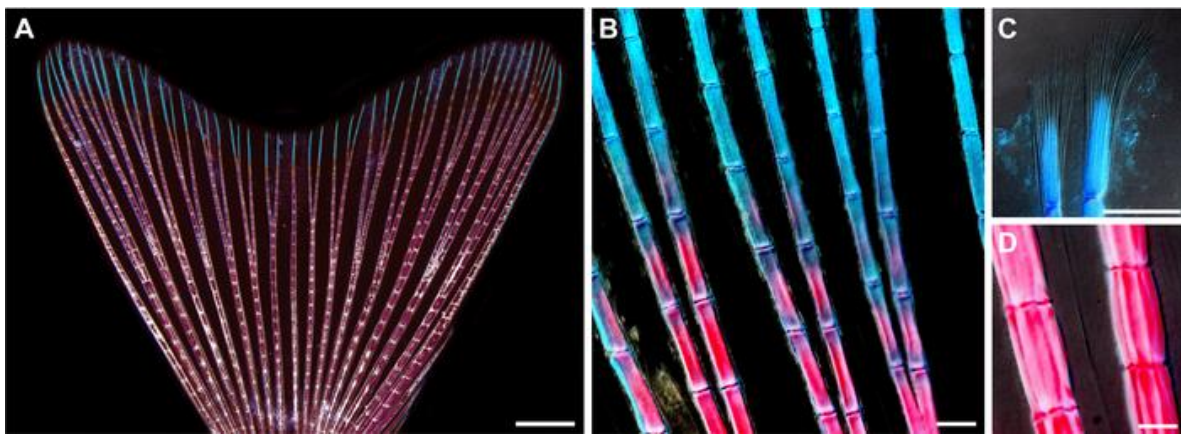


Figura 1. Esqueleto de la aleta caudal del pez teleósteo, *D. rerio*. A) aleta caudal se compone 16 a 18 segmentos llamados radios de las aletas óseas o lepidotrichia, la mayoría de las cuales están bifurcados en los extremos conectado por tejido blando (regiones no teñidas entre los huesos). Cada rayo está compuesto por un par de semirayos (1 micra). B) Aumento en la zona distal de los rayos de la aleta muestra una disminución gradual del nivel de calcificación hacia el margen de la aleta (100 micras). C) Puntas de la aleta compuestas por un cepillo de espículas llamadas actinotrichia. D) Segmentos entre rayos. Tomado de: Pfefferli y Jaźwińska, 2015.

En general, las aletas se componen de múltiples tejidos, tales como, tejido conjuntivo, lepidotrichia, actinotrichia, los vasos sanguíneos, los nervios y epidermis, los cuales deben regenerar coordinadamente para restaurar la forma y la función del órgano cuando este ha sido amputado (Pfefferli y Jaźwińska, 2015).

2.5 Modelo de regeneración de la aleta caudal de peces teleósteos

Tras la amputación de la aleta caudal, el proceso de regeneración se divide en tres etapas: (1) la cicatrización de la herida por la formación de una capa epidérmica, (2) la proliferación de células mesenquimales para la formación de blastema, (3) la diferenciación del blastema, y excrecencia regenerativa (Azevedo et al., 2012; Poss et al., 2000a; Santamaria y Becerra, 1991; Tal et al., 2010). Lo que llevará a la restauración del hueso, epidermis, vasos sanguíneos, nervios, tejido conectivo y pigmentación de la aleta regenerada (Tal et al., 2010).

Al amputar la aleta caudal se presenta muy poco sangrado e inflamación (Poss et al., 2003). Inmediatamente y dentro de las primeras 3 horas posteriores a la amputación (hpa) sucede la etapa inicial de cicatrización de la herida, que se caracteriza por no presentarse una proliferación celular, sino la migración de las células epiteliales sobre la herida cerrándola para la posterior formación de la capa epidérmica apical (AEC, por sus siglas en inglés) (Poss et al., 2003; Santamaria y Becerra, 1991; Santos-Ruiz et al., 2002; Tal et al., 2010).

A continuación, entre las 12-18 hpa, aún sin proliferación celular habrá una acumulación de capas epidermales adicionales (Poss et al., 2003). β -catenina es una de las primeras proteínas inducidas en el proceso de regeneración de la aleta caudal que se encuentra en la zona más distal de las capas de la epidermis y en niveles muy bajos en la capa basal o células mesenquimales durante todo el proceso de regeneración. La expresión de esta proteína se mantiene durante todo el proceso regenerativo. Se cree que actúa para mantener las interacciones célula-célula epidermales de la aleta, facilitando la migración de las células de la epidermis hasta la zona de la herida (Poss et al., 2000a).

Otro gen de expresión en el desarrollo de la formación de la epidermis de la herida y la formación de la AEC, es el gen *Lef1*. Este gen es detectable en las células epidérmicas antes y después de formación de la capa basal y durante la formación del blastema. Durante el desarrollo de vertebrados este gen participa para las interacciones epitelio-mesenquima, mientras que en procesos de regeneración su expresión sugiere un papel en la alineación de los escleroblastos y se teoriza que

participa en la identidad y/o señalización de las células epidérmicas de la capa basal (Poss et al., 2000a).

Transcurridas las 24 hpa se formará el blastema. Esta masa de células mesenquimales migrara hasta la zona de la herida y se coloca encima de cada rayo de la aleta cortada. El blastema es el encargado de formar las nuevas estructuras de la aleta regenerada (Azevedo y Saúde, 2011; Azevedo et al., 2012; Poss et al., 2003).

El origen de las células que van a dar la formación del blastema después de la amputación no está totalmente elucidado, pero se cree que durante la maduración de la capa de la epidermis, células madre o células diferenciadas de los diversos tejidos de los que está conformado la aleta sufre un proceso de desdiferenciación, donde células similares a fibroblastos, los escleroblastos, adquieren un estado proliferativo. Los escleroblastos se desprenden de los rayos óseos, se desdiferencian y migran distalmente para formar parte del blastema, rediferenciándose para completar la regeneración (Poss et al., 2003; Santos-Ruiz et al., 2002; Sousa et al., 2011; Tal et al., 2010).

A las 48 hpa el blastema se encarga de procesos de proliferación celular y de rediferenciación para la generación de las estructuras perdidas. El paso final de la regeneración de la aleta caudal es la excrecencia que se caracteriza por ser la etapa de proliferación y zona de re-diferenciación, donde sucederán cambios morfológicos y moleculares importantes que serán parte de la estructura regenerada (Pfefferli y Jazwińska, 2015; Poss et al., 2003). Una vez amputada la aleta, la regeneración epimórfica se completa en aproximadamente en 2 semanas en pez cebra adulto adultos, pero esto puede variar dependiendo la temperatura en la que se encuentren los peces (Iovine, 2007; Poss et al., 2003).

2.6 Vías moleculares implicadas en el proceso de regeneración

Conocer los procesos y dilucidar las redes moleculares de señalización durante la cicatrización de la herida, formación del blastema, extensión de la regeneración y la terminación del proceso de regeneración son el objetivo central en el área de la regeneración.

Al presente, se han logrado definir las moléculas de señalización que están implicados de modo similar en la regulación de la regeneración tanto en moscas como en humanos. Es claro que existen diferencias obvias en tamaño, forma y función entre apéndices no homólogos en humanos y moscas, pero aun así, estos mecanismos de señalización se conservan entre múltiples géneros y especies (Tal et al., 2010).

Gran parte de la investigación regenerativa se ha centrado en la búsqueda e identificación de genes y vías de señalización que participan durante el proceso regenerativo de la aleta caudal, desde la cicatrización hasta la diferenciación y la formación completa de la aleta, esto a través del uso de mutagénesis, pérdida, aumento o ganancia de función de genes y de estudios de expresión genética (Tal et al., 2010). Estos estudios han revelado las principales vías y genes que regulan la señalización regenerativa, entre estos se encuentran la participación de algunos ligandos clave como: el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la familia de ligandos participes en las vías de Wnt. Ambos se han identificado en procesos de regeneración en humanos, ratón, pollo, renacuajo y pez cebra (Stoick-Cooper et al., 2007; Tal et al., 2010).

Otras vías de señalización o proteínas involucradas en procesos de regeneración, por mencionar algunas han sido la vía Hedgehog, vía de Notch y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), todos participando en procesos de proliferación celular, diferenciación celular, migración, etc., (Henry y Tsonis, 2010)

2.7 Vía Wnt

Una de las vías mejor caracterizada en los procesos de regeneración de la aleta caudal ha sido la vía Wnt. Esta vía esta conservada en animales (Komiya y Habas, 2008) y regula una amplia variedad de procesos celulares como el destino de las células progenitoras, proliferación celular durante el desarrollo embrionario, organogénesis, renovación de células madres y en la regeneración epimórfica (Komiya y Habas, 2008).

En general, la vía de Wnt es regulada por estimulación extracelular, mediante la señalización de glucoproteínas de secreción, las cuales son ricas en cisteína y son llamadas Wnt que actúan como ligandos para activar o inhibir las vías de transducción de señal mediadas por receptores y regular el destino celular, la polaridad, motilidad y proliferación celular durante el desarrollo embrionario a través de la activación de múltiples cascadas de señalización intracelulares (Komiya y Habas, 2008; Tal et al., 2010). En organismos adultos que poseen esta vía, la señalización por Wnt está involucrada en mantener la homeostasis de algunos tejidos como el intestino, los huesos, y el sistema hematopoyético (Chen et al., 2008).

La señalización intracelular de los ligandos wnt secretados, se unen a uno de los miembros de la familia de receptores llamados Frizzled (Fz), y dependiendo del tipo de ligando que une a wnt, se puede estimular varias cascadas de señal intracelular, incluyendo la vía de señalización wnt canónica o también conocida como wnt- β -catenina o la vía no canónica, que se produce independientemente de β -catenina (Komiya y Habas, 2008). La vía no canónica se puede dividir en la vía de polaridad celular planar y la vía de wnt/Ca²⁺, vía de señalización Wnt-ROR2, vía Wnt-PKA, vía Wnt-GSK3MT, vía Wnt-aPKC, vía Wnt-RYK y la Wnt-mTOR. Todas las vías no canónicas muestran un alto grado de redundancia (De, 2011).

2.7.1 Secreción de los ligandos proteicos Wnt y activación de las vías de Wnt

Los genes *Wnt* han sido identificados en algunos organismos invertebrados como, insectos, nematodos, cnidarios y vertebrados (Chen et al., 2008; Komiya y Habas, 2008). Cada proteína de wnt puede tener efectos totalmente diferentes. Algunos activan la vía canónica, mientras otros participan en las vías no canónicas. De esta forma, los tipos de Wnt son generalmente clasificados de acuerdo con la vía en la que participan (Chen et al., 2008).

Actualmente, se han identificado en vertebrados 19 genes de *Wnt* y 12 receptores Fz. Los ligandos de Wnt son ricos en cisteínas, compuestos de aproximadamente 350-400 aminoácidos. Todos los ligandos de wnt parecen en la

vía Wnt Todos los ligandos de Wnt poseen un péptido señal N-terminal para la secreción y son N-glicosiladas.(De, 2011; Komiya y Habas, 2008).

Los ligandos de Wnt son glicoproteínas modificadas antes de su transporte y liberación al medio extracelular, para ser funcionales la unión a su receptor de la superficie celular. Estas proteínas son modificadas por glicosilación y palmitoilación en el retículo endoplasmático (Komiya y Habas, 2008; Saito-Diaz et al., 2013). Este paso es necesario para la secreción y actividad de Wnt, ya que alteraciones en los sitios glicosilados en los ligandos de Wnt bloquearan su secreción y por ende la activación de la vía Wnt (Saito-Diaz et al., 2013).

En el retículo endoplasmático rugoso una proteína llamada Porcupine (Porc) es una enzima que media las modificaciones lipídicas de los ligandos de Wnt y se ha demostrado que se requiere para la secreción de wnt en las células, si existe pérdida de función, ésta se acumula en el retículo endoplasmático rugoso y no sale de la célula. Una vez modificado Wnt por Porc, este viaja hasta el aparato de Golgi en un proceso mediado por la familia de proteínas p24. Una vez en el aparato de Golgi, la proteína multitransferasa conocida como Wntless, Evens Interrupted EVI o Sprinter SRT, localizada también en la membrana celular se encarga de regular la secreción de los Wnt (Port y Basler, 2010).

Wntless (Wls) directamente interactúan con Wnt y transporta a las proteínas de Wnts a la membrana plasmática para su liberación fuera de la célula. Wls se recicla desde la membrana plasmática a través de un complejo multiproteico llamado retromero, este complejo recicla Wls de la membrana plasmática de vuelta al aparato de Golgi. En ausencia del retromero, Wls se dirige a los endosomas y posteriormente es degradado (Port y Basler, 2010; Saito-Diaz et al., 2013). De manera general, las proteínas Wnt son glicoproteínas secretadas que se unen en el sitio extracelular N-terminal de la proteína transmembranal Fz que posee una homología topológica a receptores acoplados a proteínas G (Komiya y Habas, 2008). El receptor Fz posee sitios de bucle intracelular y extracelular. La región extracelular del receptor contiene un dominio rico en cisteínas (CRD, por sus siglas en inglés), donde se une el ligando y también posee sitios para las glicosilaciones.

Intracelularmente, posee un sitio C terminal que contiene los sitios (CIM PSD-95/NPV1) PDZ de unión directa a proteínas para la activación de la vía (De, 2011).

Una vez que se lleva a cabo esta unión Wtn/Fz pueden actuar diferentes co-receptores dependiendo de la vía Wnt a activarse, y serán requeridas para la mediación de la señal de la Vía de Wnt. Por ejemplo, la relacionada con baja densidad de lipoproteínas-protein5/6 (LRP5/6) que se requiere para mediar la señal Wnt canónica (Komiya y Habas, 2008)

Después, de la unión al complejo, la señal transduce una fosfoproteína citoplasmática llamada dishevelled (DSH/Dvl) que es fosforilada, actuando río abajo en la ruta de transducción de la vía Wnt. A partir de esta unión, la vía de señalización de Wnt se puede dividir en tres grandes cascadas: canónica, Wnt/Ca²⁺ y de polaridad celular planar (Komiya y Habas, 2008). Sin embargo, todavía no está claro cómo la proteína DSH regula y canales de señalización en cada una de estas vías.

2.7.2 Vía Wnt canónica

En la vía canónica, una variedad de componentes trabajan juntos para traducir una señal externa hacia el interior y producir cambios en la expresión dentro de las células diana. La etiqueta distintiva de la vía Wnt/ β -canónica es la acumulación y translocación de la proteína β -catenina al núcleo (Ochoa-Hernández et al., 2012; Saito-Diaz et al., 2013).

Cuando se lleva a cabo la unión del ligando de Wnt con Fz, sus co-receptores LRP5/6 y la proteína DSH, se presenta una estabilización de la β -catenina citoplasmática, a través de la inhibición del complejo de degradación. Entonces, β -catenina queda libre para entrar al núcleo y activar los genes regulados por Wnt, a través de su interacción con una familia de factores de transcripción y el reclutamiento de co-activadores como p300/CPB, Pigopus y BCL9/Legless que participan durante este proceso (Chen et al., 2008).

En ausencia de señalización por ligandos Wnt, β -catenina es degradada por un complejo proteico citoplasmático que incluye una enzima glucógeno sintasa

cinasa 3 beta (GSK3), una axina que mantiene el complejo unido, una proteína de supresores de tumores llamada coli adenomatosis poliposis (APC), una proteína fosfatasa 2A (PP2A), y una enzima caseína cinasa 1 alfa (CK1) que junto con GSK-3B media la fosforilación de B-catenina (Ochoa-Hernández et al., 2012). La fosforilación de β -catetina dentro de este complejo la dirige al proceso de ubiquitinación y es degradada por el proteosoma (Komiya y Habas, 2008; Ochoa-Hernández et al., 2012) (Figura 2).

En el núcleo, en ausencia de la proteína β -catenina, los genes diana de la vía de señalización Wnt son normalmente inhibidos por un complejo proteínico que incluye al factor estimulador linfoide (LEF) y al factor de células T (LEF-1/TCF) unidos a la proteína co-receptor llamada Groucho (Many y Brown, 2014). Mientras que la inhibición de la degradación de β -cateninas ocasionada por la unión de un ligando wnt a su receptor Fz y correceptores LRP5/6, resulta en la inactivación del complejo de degradación de β -catenina, lo que da como resultado la acumulación de dichas proteínas citoplasmáticas y su posterior translocación al núcleo para formar un complejo con LEF-1/TCF, desplazando a la proteína co-receptora Groucho, formando únicamente el complejo LEF-1/TCF que inicia la transcripción de los genes diana de la vía Wnt: *c-Myc*, *c-Jun*, *CCND1*, *PPARD*, *FOSL1* y *UTERIN*. (Komiya y Habas, 2008; Many y Brown, 2014) (Figura 2).

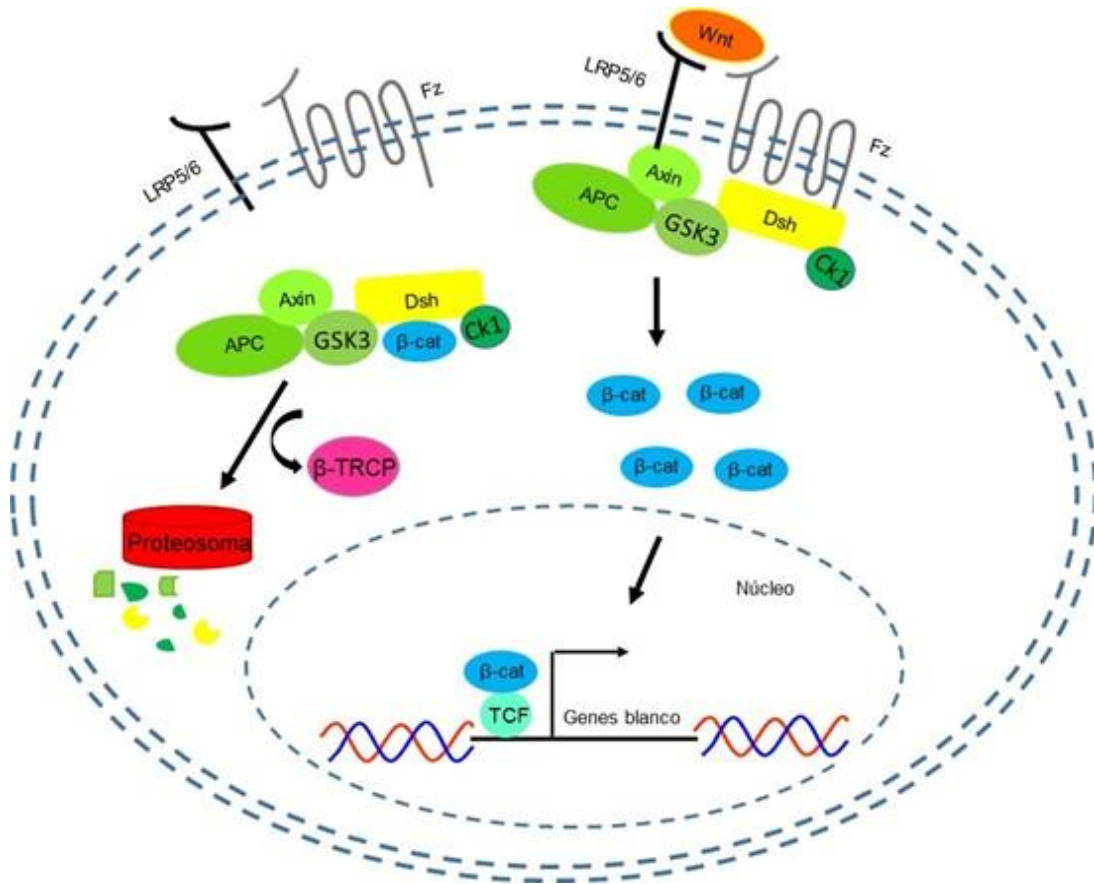


Figura 2. Vía Wnt/β-catenina (canónica). En ausencia del ligandos Wnt, B-catenina citoplasmática forma un complejo con Axin, APC, GSK3 y CK1, y es fosforilada por CK1 y posteriormente por GSK3. B- catenina fosforilada es reconocida por la ubiquitina ligada B-TrCP y la manda a degradación al proteosoma. En presencia de ligandos Wnt, este se une a receptor Fz y correceptores LRP5/6. Se une DSH y se conduce a la fosforilación de LRP5/6 y reclutamiento de Axin, mediado la fosforilación de β-catenina y su degradación. Posteriormente viaja al núcleo y se une con TCF para la activación de genes blanco.

Los ligandos que participan en la activación de esta vía y que están relacionados con el crecimiento y la proliferación celular han sido wnt1, wnt8a y wnt3a (Many y Brown, 2014). Otro de los ligandos de Wnt responsable de la activación de la señalización de la vía Wnt β-catenina durante la regeneración de la aleta caudal es wnt10a. Este ligando wnt10a se expresa temprano durante la regeneración en la punta distal del blastema (Stoick-Cooper et al., 2006).

La expresión de wnt10a se aumenta durante la regeneración, la expresión a las 3 hpa resulta ser casi 3 veces mayor que en aletas sin cortar y aumenta 5

veces más a las 6 hpa. La expresión de este ligando Wnt10a es necesario para la formación de blastema y para completar los siguientes pasos como la diferenciación celular durante la regeneración de la aleta caudal (Bouzaffour et al., 2009; Stoick-Cooper et al., 2006). El aumento tan notable de la expresión de este gen, hace a wnt10a un excelente candidato para la activación temprana de la vía wnt/ β -catenina durante la regeneración de la aleta caudal.

2.8 *Betta splendens* como potencial modelo en regeneración

B. splendens, es un pez teleósteo del orden de los perciformes, del orden Osphronemidae y suborden Anabantidae (peces laberinto) (Kowasupat et al., 2014; Latia y Aparicio, 2005; Mabee y Trendler, 1996; Rainboth, 1996). La característica principal de los peces teleósteos es la de poseer un esqueleto parcial o totalmente osificado, una vejiga natatoria y fecundación externa (Latia y Aparicio, 2005). Los teleósteos también se distinguen por la morfología de la aleta caudal, conocida como la aleta caudal homocercal (Moriyama y Takeda, 2013).

B. splendens que fue identificado por primera vez en 1909 por Regan. *B. splendens* “splendid battler” es mejor conocido como: el “pez siames *betta* peleador” o “la joya del oriente” (Hargrove y Hargrove, 1999). La idiosincrasia del pez *B. splendens* se destaca por su interés ornamental, ya que en particular los machos poseen colores llamativos con aletas grandes y de formas variadas. De tal modo, que su crianza se ha enfocado en aumentar el tamaño, y color de sus aletas. Por lo que actualmente los machos poseen aletas mucho más alargadas y coloridas que los que se encuentran en vida silvestre (Lucas, 1968).

El pez siames *betta* peleador se han reportado ser nativo del sureste tropical de Asia, en Mekong (Rainboth, 1996), en vida también se reporta en el centro y oriente de Tailandia, Indonesia, el norte de la península de Malasia, Myanmar, Singapur, Kampuchea y el sur de Vietnam (Kowasupat y Jeethong, 2012; Monvises et al., 2009; Schindler y Linke, 2013; Schindler y Schmidt, 2006; Tan, 2005; Witte y Schmidt, 1992). Actualmente, el uso ornamental de este pez ha logrado que se pueda encontrar en acuarios de todo el mundo (Hargrove y Hargrove, 1999).

En general, las especies de *Betta sp.* habitan el agua dulce como: canales, ríos, campos de arroz de aguas poco profundas, aguas estancadas o contaminadas o en otro tipo de áreas que contengan bajas concentraciones de oxígeno (Hargrove y Hargrove, 1999; Rainboth, 1996). *Betta*, presenta un órgano respiratorio adicional localizado en las agallas, conocido como “órgano laberinto”, compuesto por numerosas láminas vascularizadas bajo el opérculo que les permite a los peces *Betta* respirar oxígeno atmosférico, habilitándolos para vivir en aguas con poco oxígeno (Jovel, 2000). Este órgano también les permite la respiración en aguas con temperaturas elevadas, las cuales poseen niveles bajos de oxígeno condiciones que serían letales para otros peces (Rainboth, 1996).

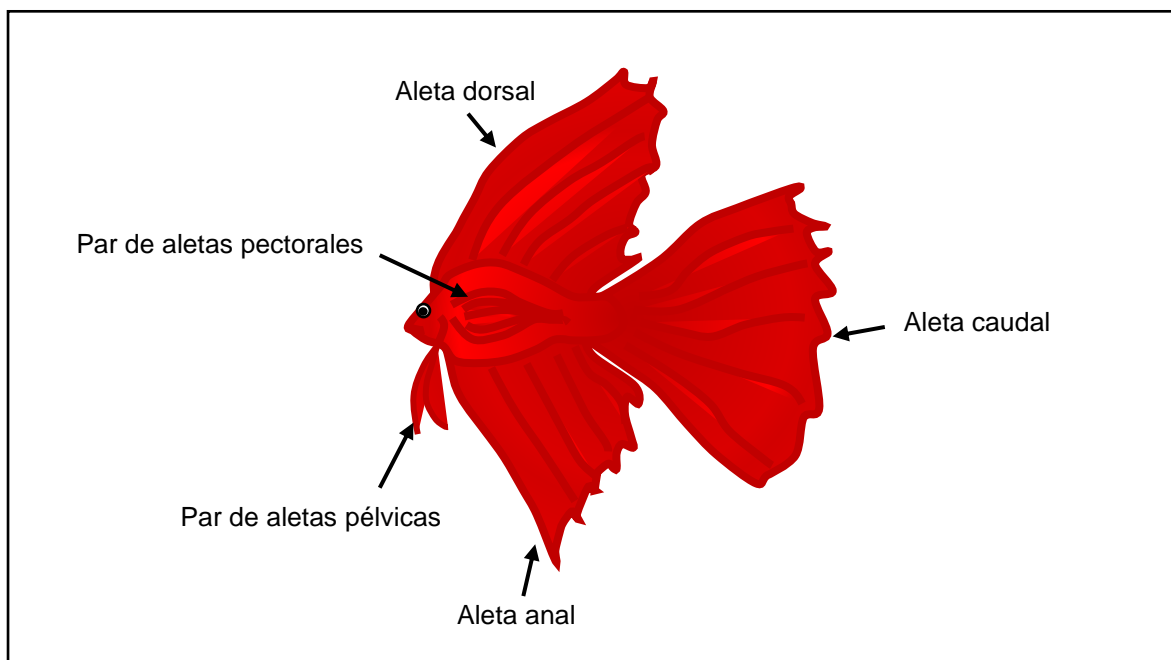


Figura 3. Aletas caudales de *B. splendens* adulto. *B. splendens* está formado por 7 aletas. Un par de aletas pectoral, par de aletas pélvicas, una aleta anal, una dorsal y una caudal.

En vida silvestre los peces *Betta* se encuentran en aguas cálidas que oscilan entre los 24 a 30°C (Rudiger Riehl y Hans A. Baensch, 1996), en pH entre 6 y 8. En promedio, *B. splendens* mide entre 6 y 7 cm de longitud, siendo las hembras de un tamaño menor al de los machos (Hargrove y Hargrove, 1999; Rainboth, 1996), con un periodo de vida de aproximadamente 2 años. Posee un cuerpo fusiforme, con siete aletas: una aleta caudal, una aleta dorsal, dos aletas

pélvicas, un aleta anal, y dos aletas pectorales (Hargrove y Hargrove, 1999) y comparado con el macho de *Betta*, las hembras poseen aletas más pequeñas y colores menos llamativos.

El cuerpo está cubierto de escamas superpuestas una de la otra, creciendo hacia fuera de la piel. La piel de estos peces posee células pigmentarias llamadas cromatóforos que les otorgan coloraciones distintas. Estas coloraciones las pueden usar como defensa a depredadores o para atraer a su pareja. De manera silvestre, *Betta* se alimenta de zooplancton, mosquitos, y larvas de insectos (Rainboth, 1996).

B. splendens es un modelo atractivo para la investigación debido a que posee un tamaño pequeño que lo hace conveniente para su mantenimiento en el laboratorio, además de poseer resistencia a temperaturas elevadas, capacidad de sobrevivir en concentraciones bajas de oxígeno, sin necesidad de una bomba de oxígeno (Lucas, 1968). Por otra parte, sus características físicas tales como, la amplia variación de colores, tamaños grandes y variables de la forma de las aletas, a su vez la investigación regenerativa se puede realizar desde un apéndice externo como lo es la aleta caudal, mediante manipulaciones sencillas como el rápido corte de la aleta, lo que sería menos posible para órganos internos, estas características lo hacen un excelente modelo de laboratorio. (Lucas, 1968; Pfefferli y Jaźwińska, 2015).

De las características más notables de esta especie es la agresividad de los machos con otros machos de su misma especie, con los que entabla peleas competitivas para proteger su territorio y a las hembras que habitan con él (Alves, 2008; Simpson, 1968). Los machos *Betta* estiran sus aletas como actitudes de visualización que muestran la agresión y la atracción sexual (Simpson, 1968).

El uso principal de *B. splendens* ha sido en combate contra otros peces en concursos deportivos. Al principio, su obtención se limitó a los peces obtenidos en aguas abiertas, pero, con el fin de asegurar un modelo virtuoso para ganar en combate, se inició la domesticación y reproducción selectiva (Lucas, 1968). Actualmente, la producción de estos peces también se ha enfocado en la apreciación de su belleza, debido a su gran variedad de sus colores y en la forma y

dimensiones de sus aletas. Lo que ha llevado a la cría selectiva hacia la mejora en combate a través de la selección para aumentar la agresión y la resistencia física (Hargrove y Hargrove, 1999; Lucas, 1968). De manera ornamental, su reproducción se ha enfocado en la obtención de nuevas variaciones en el color, tamaño y forma de sus aletas (Hargrove y Hargrove, 1999; Lucas, 1968).

Estos aspectos de comportamiento y selección de fenotipos más tarde se propusieron y convirtieron en objeto de investigaciones genéticas (Umrath, 1939; Wallbrunn, 1958), de embriología (Groth, 1970), estudios de comportamiento (Braddock y Braddock, 1959; Hess, 1952; Marrone et al., 1966), inclusive estudios sobre esquizofrenia (Moody y Smith, 1956).

Actualmente, la investigación de pérdida y regeneración de la aleta caudal del pez *B. splendens* se limita a preguntas en internet de pérdida de la aleta caudal ocasionada por lesiones físicas, mordeduras durante combate o por infecciones bacterianas o fúngicas en blogs de expertos en el cuidado y mantenimiento de *B. splendens*, pero no existe evidencia científica que reporte el tiempo y el proceso de regeneración de la aleta caudal, así como genes implicados en regeneración.

3. JUSTIFICACIÓN

En el campo de la investigación regenerativa, uno de los objetivos es el estudio de los procesos de la regeneración en organismos modelo, debido a que no todos los organismos vivos tienen las mismas capacidades regenerativas. Por lo tanto el interés se ha enfocado en aquellos que poseen capacidades flagrantes para reparar extremidades, tejidos u órganos perdidos para su aplicación en el campo de la medicina regenerativa.

El estudio de estos organismos usados como modelo en la investigación regenerativa está enfocado en la aplicación de conocimientos sobre los mecanismos moleculares y genéticos para desarrollar terapias dirigidas a la mejora de los procesos regenerativos en seres humanos (Stoick-Cooper et al., 2007). Si bien, los mecanismos celulares y los tipos de células implicados en la regeneración de estos sistemas pueden variar ampliamente, se ha determinado que las señales moleculares y de genes implicados pueden ser compartidas durante el proceso de regeneración entre especies (Gemberling et al., 2013; Stoick-Cooper et al., 2007).

B. splendens, es un pez teleósteo que actualmente está propuesto en estudios de tipo genéticos (Umrath, 1939; Wallbrunn, 1958), de embriología (Groth, 1970), estudios de comportamiento (Braddock y Braddock, 1959; Hess, 1952; Marrone et al., 1966) o esquizofrenia (Moody y Smith, 1956), pero no en procesos regenerativos. Entre las cualidades que posee este pez para ser utilizado como modelo en estudios de regeneración se encuentra lo grande de su aleta caudal, que puede incluso sobrepasar el tamaño del cuerpo del pez, facilitando el corte de la aleta y visibilidad durante el proceso de regeneración. También, posee un órgano laberinto que le permite respirar oxígeno atmosférico, lo cual tiene ventaja para la manipulación del organismo fuera del agua. A su vez, *B. splendens* posee un genoma de aproximadamente 624 Mb, que es pequeño en comparación con 1,700 Mb de *D. rerio*, el pez modelo usado en regeneración o el cnidario *Hydra attenuata* con 3618 Mb, otro modelo usado en regeneración. Un genoma compacto puede ser ventajoso como un modelo genómico. Se sabe que incluso entre organismos eucariotas unicelulares hasta los seres humanos existe una gran cantidad de genes

que son muy similares permitiendo la comparación y experimentación funcional de los genes y sus productos, así como sus secuencias regulatorias (Venkatesh et al., 2000).

El poseer un genoma pequeño facilita la caracterización y estudio de genes ya que en genomas de mamíferos se dificulta al poseer más del 95% de su ADN no codificante. Pero, un genoma compacto podría ayudar a acceder más fácilmente a secuencias de regiones codificantes y regulatorias (Elgar, 1996). En el pez *B. splendens* con un genoma compacto, sus genes estarán densamente empaquetados. Esto significa que se pueden secuenciar completamente a una fracción del costo de la secuencia del genoma de los mamíferos.

Una de las vías más entendidas y conservadas en metazoos durante el proceso de regeneración es la señalización Wnt/ β -catenina (Shah et al., 2011). Esta vía es un importante regulador de la proliferación celular y destino de las células durante la regeneración de la aleta participando en la formación y proliferación de células del blastema; en la maduración de los osteoblastos para la formación de los rayos de la aleta y los patrones de formación de la epidermis hasta la excrecencia regenerativa, el último paso del proceso de la regeneración de la aleta caudal (Stoick-Cooper et al., 2006; Wehner et al., 2014). Por lo tanto, la señalización de Wnt es útil para el estudio de la regeneración en muchas especies y en diferentes apéndices, tejidos u órganos con la capacidad de regenerar (Shah et al., 2011) incluyendo a *B. splendens*.

4. HIPÓTESIS

- I. *Betta splendens* posee capacidad regenerativa en la aleta caudal.
- II. *Wnt10a* está presente a las 72 horas posteriores a la amputación en la aleta caudal de *B. splendens*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- I. Registrar la capacidad regenerativa y confirmar la presencia de ligandos *Wnt10a* durante el proceso regenerativo de la aleta caudal de *Betta splendens*

5.2 Objetivos Particulares

- I. Registrar el tiempo de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens* a temperatura ambiente.
- II. Cuantificar el área regenerada de la aleta caudal de *B. splendens* a temperatura ambiente.
- III. Cuantificar el crecimiento de los rayos durante la regeneración de la aleta caudal.
- IV. Identificar el gen *Wnt10a* implicado en la vía Wnt/ β -catenina en la aleta caudal de *B. splendens* antes y después del corte de la aleta caudal.

6. METODOLOGÍA

6.1 Declaración ética

Todos los experimentos con *B. splendens* fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, registrado con el expediente 28FCN2016.

6.2 Mantenimiento de los animales

Se utilizaron 3 peces *B. splendens* machos adultos adquiridos de PETCO, Querétaro, México. Los peces se mantuvieron en una pecera de vidrio separada en tres secciones de 20x15x15 cm cada sección para evitar que los peces tuvieran contacto visual entre ellos, por lo que se puso entre cada división de vidrio un plástico azul y se nombraron de izquierda a derecha como Betta 1, Betta 2 y Betta 3 (Figura 4). La pecera fue llenada en cada sección con 4 litros agua embotellada a temperatura ambiente, cambiándose por completo el agua cada 5 días, sin bomba de oxígeno y fueron alimentados con Micropelét flotante dos veces al día (mañana y noche). A cada cambio de agua la pecera se acondicionada “*BettaSafe*”, usado para prevenir enfermedades comunes provocadas por bacterias, hongos y parásitos, además, elimina el cloro del agua y neutraliza elementos como el flúor, yodo y metales pesados como el plomo, cadmio, zinc, entre otros. La temperatura se registró con un termómetro diariamente en las mañanas y noches durante todo el proceso experimental.



Figura 4. Representación de la pecera de alojamiento de los peces. Muestra la pecera dividida por un muro de vidrio más un muro de plástico azul para evitar la visibilidad entre peces. Los peces fueron nombrados de izquierda a derecha como Betta 1, Betta 2 y Betta 3.

6.3 Preparación del anestésico

Los peces *B. splendens* fueron anestesiados con 100 µl/L de aceite de clavo (eugenol), condiciones previamente reportadas para *D. rerio* (Grush et al., 2004). En un litro de agua embotellada a temperatura ambiente (misma temperatura del agua de las peceras donde están alojados los peces), se mezcló 100 µl de aceite de clavo sin uso de algún disolvente orgánico y se revolvió enérgicamente (Llanos et al., 2012) .

6.4 Anestesia y amputación de la aleta caudal

Para la anestesia se empleó el método de anestesia por inmersión, donde cada pez individualmente fue sumergido en 1L de solución anestésica sin uso de disolvente orgánico (Llanos et al., 2012). Al ser una concentración usada para *D. rerio* primero se evaluó si esta concentración tenía efecto anestésico para *B. splendens*, para ello, se observó el comportamiento de los peces y se registró el tiempo y recuperación de la anestesia. La eficiencia del anestésico fue dada por la pérdida total del equilibrio, sin una visible respuesta o reacción durante su manipulación y sin la presencia de movimientos operculares (Hinostroza y Serrano-Martínez, 2013; Millán-Ocampo et al., 2012).

Los tiempos fueron cronometrados desde el momento de la introducción de pez al eugenol hasta la pérdida de movimientos operculares durante la anestesia, y el tiempo cronometrado de recuperación desde la introducción del pez en la pecera con agua libre de eugenol hasta la recuperación total del eje de nado. Los tiempos fueron obtenidos con ayuda de un cronometro digital.

Una vez bajo el efecto de la anestesia, el pez se sacó del agua y la zona opercular se tapó con una gaza húmeda de la misma solución anestésica para evitar el menor contacto de las branquias con el aire. Después, se fotografió la aleta caudal de cada pez y esta fue amputada con una navaja de afeitar estéril (Poss et al., 2000b). La aleta amputada fue colectada en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL con 500 µL de Trizol. Tras el corte, se fotografió nuevamente la aleta caudal, pero ahora ya amputada. Todas las muestras de aleta caudal se mantuvieron a -20°C hasta su uso (Figura 5).

Después de que se cortó y fotografió la aleta caudal, los peces de manera individual fueron transferidos a una pecera libre de aceite de clavo para evaluar el tiempo de recuperación de la anestesia hasta que los peces recuperaron totalmente el eje de nado (Millán-Ocampo et al., 2012), (Figura 5).

Trascurridas las 72 horas post-amputación (hpa) nuevamente los peces se anestesiaron con la misma concentración y se amputo la cola en el sitio donde fue realizado el primer corte (Azevedo y Saúde, 2011). Antes y después de cada corte se registró cada corte con una fotografía. Las aletas caudales se guardaron a -20°C hasta su uso. Nuevamente se tomaron los tiempos de anestesia y recuperación.

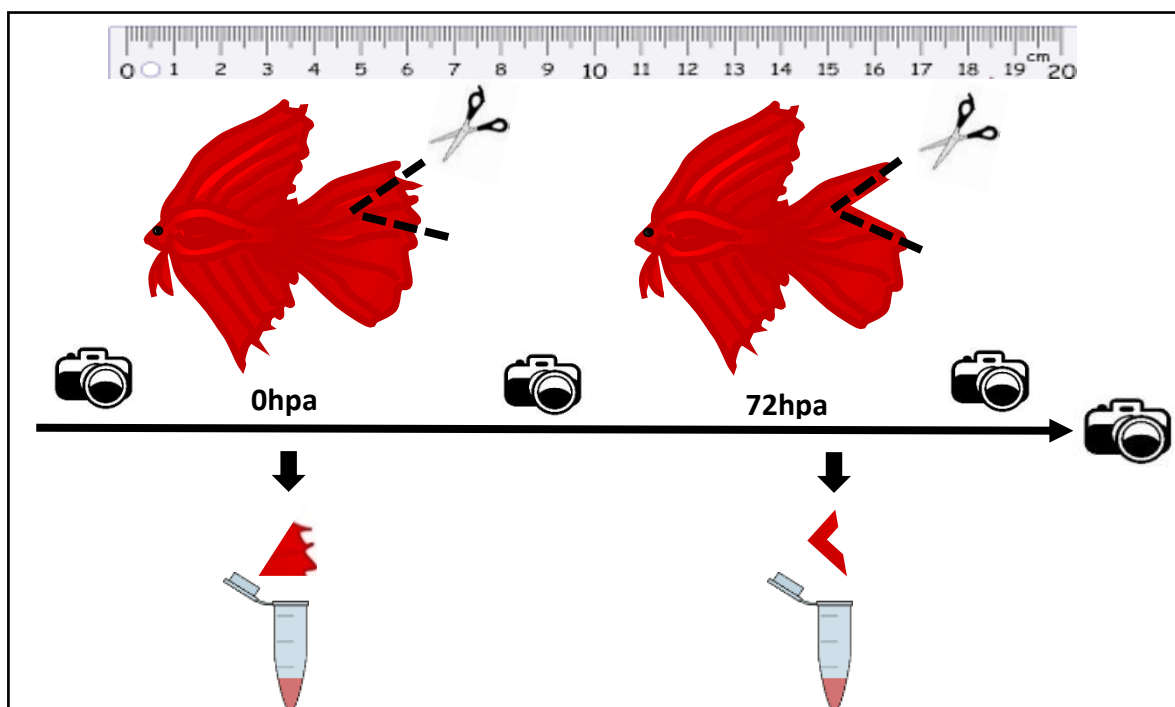


Figura 5. Esquema de las amputaciones de la aleta caudal de *B. splendens*. A las 0 hpa se fotografió y amputo la aleta caudal el tejido se recogió y se guardó en Trizol. Después se sometió a una segunda amputación y se recogió el tejido amputado y se guardó en Trizol, la aleta caudal se fotografió. El proceso de regeneración se continuó fotografiando hasta completarse.

6.5 Cuantificación de la zona regenerada de la aleta caudal

Para poder cuantificar el área de la zona regenerada, durante 8 semanas se colocó una regla en escala de centímetros y milimétrica junto con el pez anestesiado para el análisis en IMAGEJ y se fotografió la cola de los peces *B.*

splendens. Para poder fotografiar, se anestesiaron con 100 μ L de aceite de clavo, descrito anteriormente. El área y largo del crecimiento del rayo durante el proceso de regeneración donde se realizó el corte de la aleta caudal fue medido y usando el software IMAGEJ con la herramienta color threshold para obtener una mejor distinción entre la zona regenerada y la no regenerada (Figura 6).

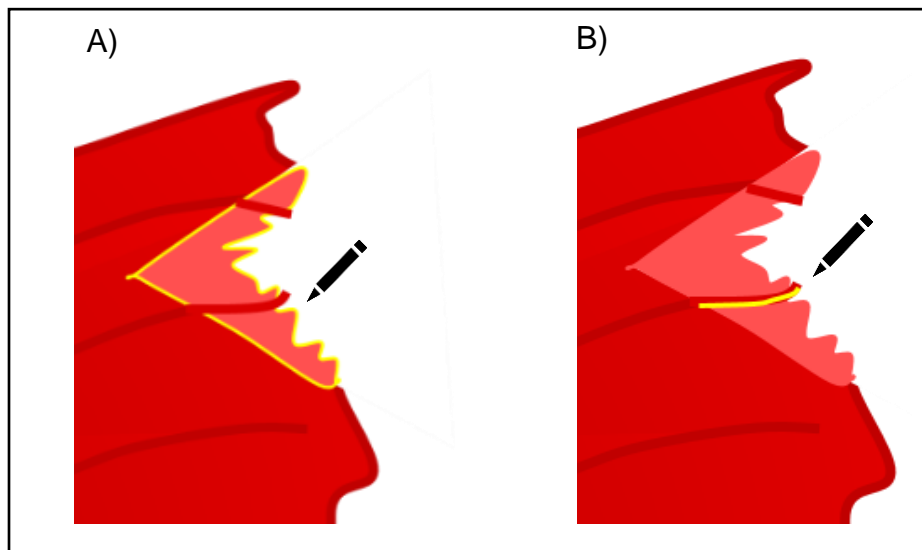


Figura 6. Cuantificación de la zona regenerada de la aleta caudal. Se usó IMAGEJ con la herramienta color threshold para obtener una mejor diferencia entre las zonas regeneradas y sin regenerar. Se midió al área de la zona regenerada (A) y el crecimiento de los rayos (B), marcados en amarillo.

6.6 Extracción de ARN por técnica de Trizol y obtención de ADN complementario

Por medio de la técnica de Trizol (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante, se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) de la aleta caudal de *B. splendens* de los corte 0 hpa y 72 hpa, el ARN se mantuvo a -80°C hasta su uso. Después, de la extracción de ácidos nucleicos, se realizó la síntesis de AND complementario a partir de los RNA usando la técnica de transcripción reversa (RT) por la enzima transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). Se añadió 1 ng de ARN total, 1 μ L de oligo dT, 1 μ L de dNTP Mix y 12 μ L de agua destilada estéril en un tubo eppendorf

estéril y se calentó a 65°C por 5 minutos. Luego se enfrió en hielo. Se añadió 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 2 µL de 0.1 de M DTT y se incubó a 42°C por 5 minutos. Después se agregó 1 µL de SuperScript II RTy se incubó a 42°C por 50 minutos. Se inactivó la reacción a 70°C por 15 minutos y la muestra se guardó a -20°C hasta su uso.

6.7 Cebadores

B. splendens es un organismo no secuenciado, por lo tanto, los cebadores fueron primers degenerados. Para ello se buscaron organismos filogenéticamente relacionados y se seleccionaron a los peces teleósteos (*Salmo_salar*, *Austrofundulus limnaeus*, *Oreochromis niloticus* y *Haplochromis burtoni*). Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias correspondientes al mensajero del gen *Wnt10a* a modo de localizar las regiones más conservadas para lograr el óptimo diseño de los cebadores, el alineamiento se realizó con el programa ClustalW, versión 2.0.12. Los cebadores para *Wnt10a* resultantes fueron para los forward: FBs1_Wnt10a 5'-GAGTGCSAGCACCAAGTTCAG-3', FBs2_Wnt10a 5'-GAACTGYTCCAGCCTGGAG-3' y FBs1_Wnt10a 5'-GGTTYCGAGAGAGTGCCTT-3'. Para los reverse: RBs1_wnt10a 5'-ACCACGTAYCAGCACCAAGTG-3' -3', RBs1_wnt10a 5'-CTGACCCACTCTGTTATRG-3' y RBs1_wnt10a 5'-TCTTCATTTYCAGACYCTCAC-3'. La longitud de los cebadores está entre 900 a 1000 bases aproximadamente.

6.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa (RT-PCR)

La técnica se estandarizó para los cebadores degenerados de *Wnt10a* para *B. splendens*. Las condiciones ideales según la longitud de amplificación son: 36 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 2.15 minutos.

6.9 Electroforesis

La separación de las bandas de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con Bromuro de etidio a 100V por 25 minutos.

7. RESULTADOS

7.1 Tiempo de anestesia y recuperación del eje de nado

El período experimental duró 71 días (10 semanas con 1 día), los días post-amputación durante el proceso de regeneración duraron 68 días (68 dpa), debido a que se realizaron dos cortes se contó el tiempo 72 hpa como tiempo cero para visualizar el proceso de regeneración, período donde terminaron las amputaciones y se determinó el tiempo de regeneración de la aleta caudal.

No se presentaron casos de mortalidad antes, durante, o después de la inducción anestésica y recuperación en los individuos durante todo el proceso experimental. Al momento de introducir a los peces *Betta* a la solución anestésica todos presentaron episodios de nado rápido, esporádico y con cambios bruscos rápidos en la dirección de nado, después iban a la superficie y presentaban reflejos de regurgitación. Conforme pasaba el tiempo dentro de la solución anestésica, el pez bajaba la velocidad de sus movimientos y se hundía en el fondo de la pecera manteniendo únicamente movimientos operculares hasta la inmovilización de estos. Los movimientos rápidos y sin dirección de nado rápido no presentaron en la fase de recuperación de la anestesia, el pez al ser introducido al agua libre de eugenol inmediatamente recuperaba los movimientos operculares y de las aletas pectorales hasta la recuperación total del eje de nado.

Se tomaron los tiempos de anestesia de *B. splendens* a una concentración de 100µl/L hasta que el pez presento colapso medular. A esa concentración se facilitó la amputación de la cola sin estresar al pez o que este reaccionará al corte. El criterio general para considerar que los peces estuvieran anestesiados, además de los movimientos operculares imperceptibles, fue la pérdida de respuesta motora, es decir, cuando el pez dejo de nadar y no presentó respuesta alguna al estímulo mecánico. A los 42 dpa el pez *Betta* 1 fue retirado del experimento debido a que la aleta comenzó a dañarse, presentando pequeños cortes y ligeramente quebrada en la punta distal de la aleta caudal.

Posteriormente, a los 46 dpa el pez *Betta* 3 también mostro signos iguales en la aleta caudal como el *Betta* 1, por lo que también se retiró del experimento, por

lo que se mantuvieron en observación, para determinar si era causado por estrés o algún proceso infeccioso fúngico o bacteriano, los peces Betta 1 y Betta3 fueron retirados de la pecera dividida y se colocaron en peceras individuales. Para el día 51 dpa el pez Betta 1 presentó en la pecera pequeños hilos blancos, como algodoncillo, y mayor deterioro no solo en la aleta caudal, también en la anal y dorsal, mientras que el pez Betta 2 ya no presentó avances en el deterioro de la aleta caudal. Los signos evidencian un proceso infeccioso fúngico que está afectando las aletas de los *Betta*. Para evitar el progreso de la enfermedad y la posible infección del Betta 2, se agregó una gota por litro de verde malaquita y se aumentó la temperatura a 28°C con un termostato por cuatro días, siguiendo con el tratamiento indicado por el producto “*Green Bac*” de verde malaquita. El pez Betta 3 se recuperó del daño en la aleta caudal, mientras que el pez Betta 1 continuó con la infección hasta su fallecimiento el día 68 dpa.

Debido a la infección que presentaron dos de los tres peces, el animal experimental de todo este trabajo fue el Betta 2. El promedio de la anestesia hasta que los movimientos operculares no se observaron fue de 5 minutos con 40 segundos con un error estándar de ± 34 segundos. La recuperación del efecto anestésico con el completo eje de nado presentó un promedio de 15 minutos con un error estándar de ± 4.7 minutos.

7.2 Temperatura ambiente promedio de las peceras

Cuadro 1. Temperatura ambiente del agua de las peceras

Temperaturas diarias	Temperatura °C Promedio	Error estándar
Mañanas	23.11	1.95
Noches	23.28	1.95
Promedio mañana/noche	23.19	1.94

Durante todo el periodo experimental se registraron las temperaturas del agua de las peceras de *B. splendens* dos veces al día: mañana y noche. En base a lo reportado en la literatura, la temperatura es un factor determinante para la rapidez regenerativa en peces teleósteos. La temperatura promedio registrada hasta el 68 dpa (día 71) fue de 23.19 °C con un error estándar de ± 1.94 °C.

Aunque la temperatura promedio fue de 23.19°C, el promedio de la temperatura ambiente del agua registrada por día vario ampliamente. La gráfica 7, muestra la temperatura promedio por día, en ella se observa que las temperaturas promedio por día más bajas se registraron entre los días 19 y 21. Mientras que entre los días 23 y 31 se presentaron los días más calurosos con temperaturas entre 25°C y 26.5°C. Después, en la gráfica 7 se muestra un aumento de temperatura a 28°C por 5 días entre los días 59 y 63, esto debido al tratamiento preventivo para el pez Betta 2 y tratamiento terapéutico para los peces Betta 1 y 3 con verde malaquita.

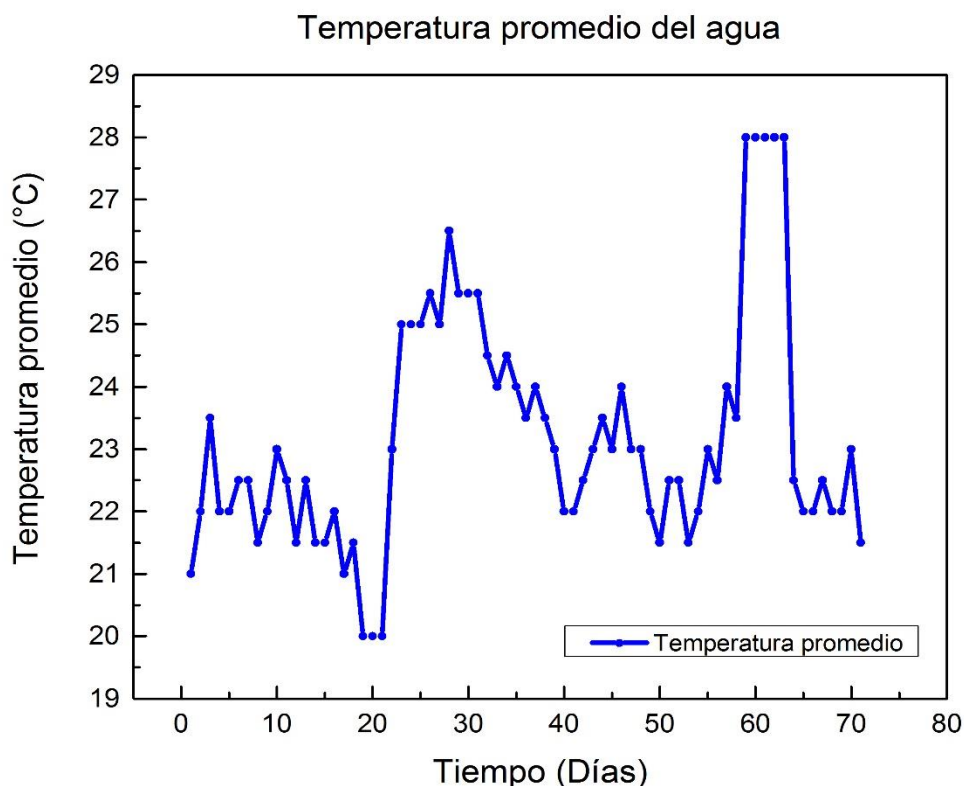


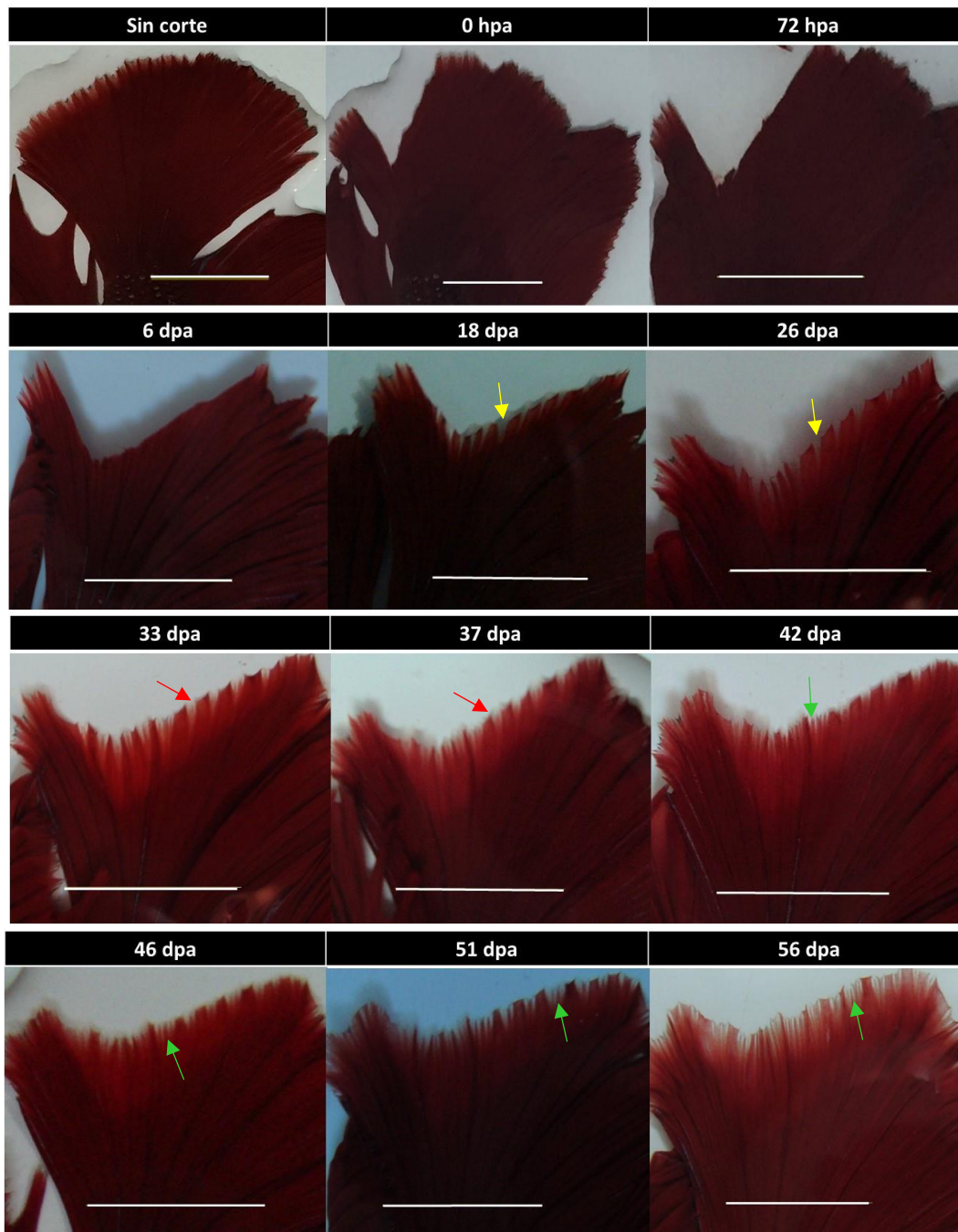
Figura 7. Temperatura ambiente promedio registrada en agua de la pecera. Los puntos azules muestran la temperatura promedio de la mañana y noche registrada en durante todo el proceso experimental.

7.4 Tiempo de regeneración de la aleta caudal

La regeneración de la aleta caudal de *B. splendens* fue documentada mediante fotografías. Durante 68 dpa se observó el crecimiento de la aleta caudal del pez Betta 2. Como se realizaron 2 cortes a las 0 hpa y 72 hpa, el segundo corte fue tomado como tiempo cero para contar los días de regeneración de la aleta caudal de la figura 8.

Durante el proceso experimental, se observó que la aleta caudal de *B. splendens* si regenera. Una de las principales características que mostró el proceso de regeneración de la aleta caudal es que esta siempre presenta pigmentación, esto se puede observar a partir de las imágenes de 18 dpa (Figura 8). Después de la primera amputación a las 0 hpa hasta los primeros 3 días (72 hpa) donde se realizó un segundo corte se observa una pequeña línea blanca-transparente visible solo al ojo humano, pero sin poderse capturar con la cámara digital usada.

A partir de los 18 dpa y hasta el 68 dpa se presenta una muy delgada línea blanca-transparente en toda la parte distal amputada de la aleta caudal entre los rayos y sobre los rayos, ver figura 10. A los 18 dpa y 26 dpa se muestra claramente el crecimiento de rayos y un espacio vacío sin coloración entre cada formación del rayo señalado con flechas amarillas. A partir del 33 dpa se observa pigmentación entre los espacios que se veían vacíos a las 18 dpa y 26 dpa señalado con flechas rojas (Figura 8). Al 37 dpa se observa una mayor uniformidad de pigmentación pero aun distinguiéndose el área regenerada del área sin amputar, también se observa que a los 42, 51 y 56 dpa las áreas pigmentadas que parecían ser el interrayo ahora presentan delgadas líneas tipo rayo, flechas verdes (Figura 8 y 9). A los 52 y 58 dpa la regeneración casi se ha completado y ha ganado una mayor pigmentación, lo cual ya no permite distinguir tan fácilmente el área original de la regenerada.



Continuación

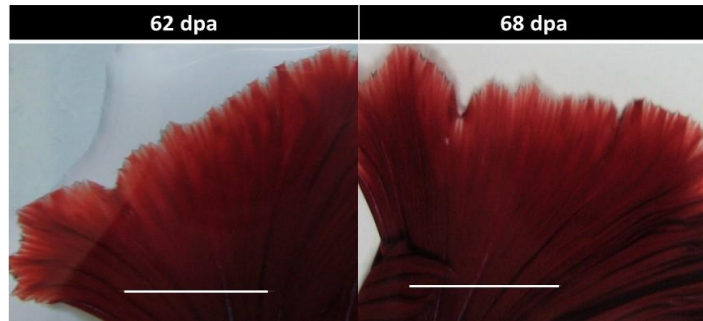


Figura 8. El proceso de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens*.

Transcurso en el tiempo durante el proceso de regeneración a una temperatura promedio de 23°C. Sin corte, se muestra una aleta caudal en su tamaño original antes de la amputación. A las 0hpa, se realizó el primer corte de la aleta caudal. 72 hpa, se realizó un segundo corte de la aleta caudal. 6dpa, no presenta crecimiento de la aleta caudal. En 18 dpa se aprecia una excrecencia regenerativa, con la presencia de formación de rayos y pigmentación, la flecha amarilla muestra un espacio entre los sitios regenerados. A las 26 dpa se aprecia una ganancia del área regenerada, presentando aun espacios vacíos ente las regiones regeneradas. A partir de las 33 dpa se presentan pigmentación y crecimiento de los espacios vacíos vistos anteriormente (flecha roja). A partir de los 42 dpa hasta los 56 dpa, se muestra la presencia del desarrollo de delgados rayos entre los espacios que estaban únicamente pigmentados anteriormente, flechas verdes. A partir del 62 dpa es imposible distinguir los la división entre rayos y áreas pigmentadas, debido a que el área regenerada gana una mayor pigmentación, resultando difícil distinguir el área que se ha regenerado durante todo el proceso. Escala 1 cm.



Figura 9. Aleta Caudal de *B. splendens* en regeneración. Se observa la zona de regeneración con un a tono rojizo más tenue que el resto de la aleta y la formación de rayos, rayos delgados e interrayos.



Figura 10. Aleta Caudal de *B. splendens*. Se observa la zona de regeneración una capa blanca-transparente al final de la aleta y al final entre los rayos de la aleta.

La figura 11, muestra el proceso de regeneración en tres imágenes. Del lado izquierdo la aleta caudal sin amputación (A), en medio la aleta caudal amputada a las 72 hpa (B) y a la derecha la aleta caudal regenerada hasta el 68 dpa (C). Se puede apreciar que el ángulo generado a partir del corte triangular durante el proceso regenerativo de la aleta es el último en regenerarse a los 68 dpa, ya que aún se logra apreciar donde se encontraba el ángulo del corte, (círculos amarillo). Probablemente por ser el área más lejana del final de la aleta caudal este segmento el tiempo para cubrir esa zona sea mayor y por ende sea el último en regenerar.

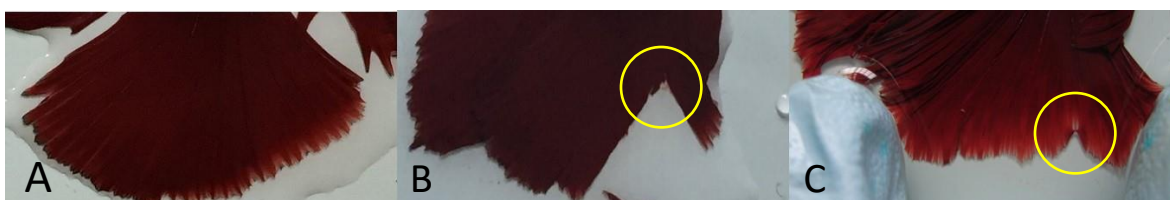


Figura 11. Proceso regenerativo de la aleta caudal. A) Aleta caudal sin amputar, B) Aleta caudal amputada y C) Aleta caudal regenerada a los 68 dpa. Circulo amarillo: ángulo generado por el corte triangular de la aleta caudal.

7.5 Área de regeneración de la aleta caudal

Este es un estudio descriptivo por lo que solo se midió el área de regeneración y longitud del crecimiento del rayo (Figura 6) mediante el programa IMAGEJ, un programa para el procesamiento de imágenes digitales, de las cuales se puede calcular el área, medir distancias y ángulos de un objeto. Una de las herramientas usadas en este trabajo para poder distinguir claramente y contrastar entre la zona regenerada y no regenerada fue la herramienta “Color Threshold”, para calcular el área y graficar el regenerada. Al graficar el crecimiento del área regenerada, la gráfica parece presentar un crecimiento exponencial, ya que conforme pasa el tiempo la regeneración de la aleta caudal continua (Figura 12).

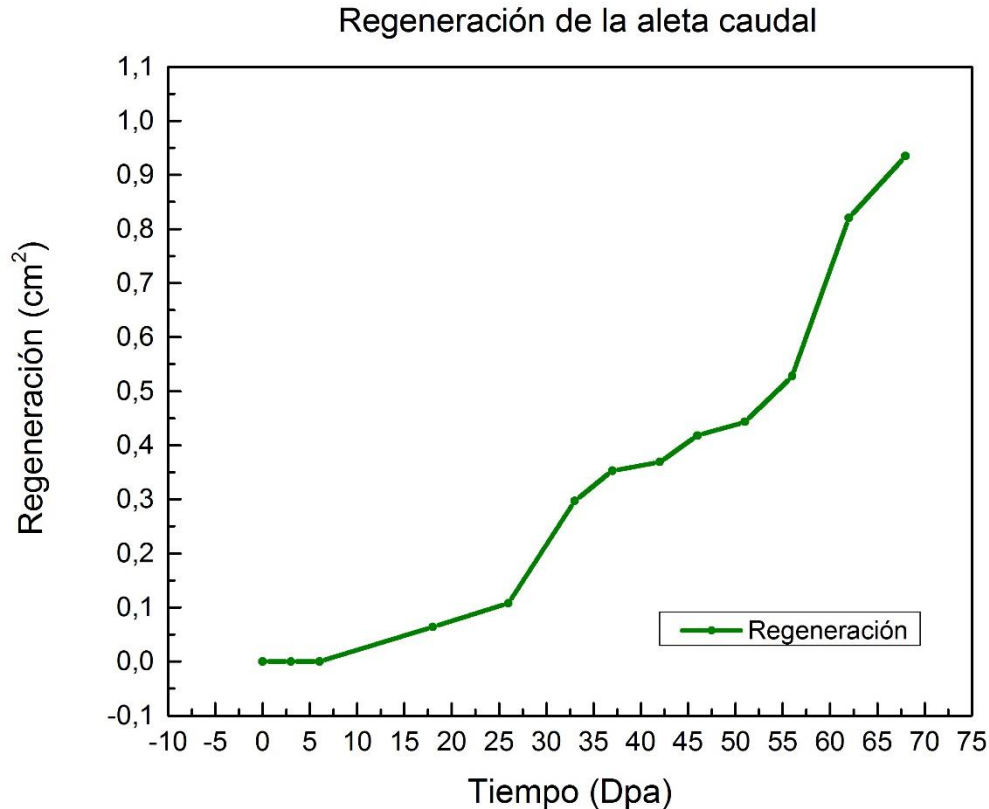


Figura 12. Área de regeneración de la aleta caudal en cm² en función del tiempo. La regeneración incrementa respecto al tiempo de forma no lineal. El incremento a partir del día 6 según el registro fotográfico se observa una aceleración de la regeneración con respecto al tiempo, con un crecimiento tipo exponencial.

Después se midió cuanto era el área regenerada entre que entre cada registro fotográfico que mostraba el proceso de regeneración, ver figura 11. El crecimiento del área regenerada se muestra hasta el día 18 dpa, después de este tiempo la regeneración del área amputada continua. La figura muestra que a los 33 dpa un crecimiento casi tres veces mayor al registrado a los 26 dpa. La temperatura promedio registrada en los días previos a la fotografía 33 dpa están entre los 25 y 26.5 °C, estas fueron las temperaturas más alta registrada a temperatura ambiente (figura 7, o parte superior izquierda de la figura 13). También, 5 días previos a la toma de la imagen 62 dpa, se presentó el mayor aumento en la regeneración de la aleta caudal, en estos 5 días previos a la los 62 dpa se aumentó la temperatura con

un termostato a 28°C, esto con el fin de evitar la enfermedad en el Betta 2, ya que los otros dos peces fueron descartados del estudio debido a una infección fúngica. Al comparar la imagen 7 con las 13 se puede observar que los dos periodos registrados de mayor temperatura se relacionan con el aumento en la regeneración de la aleta caudal del pez *B. splendens*.

Área de regeneración entre cada fotografía

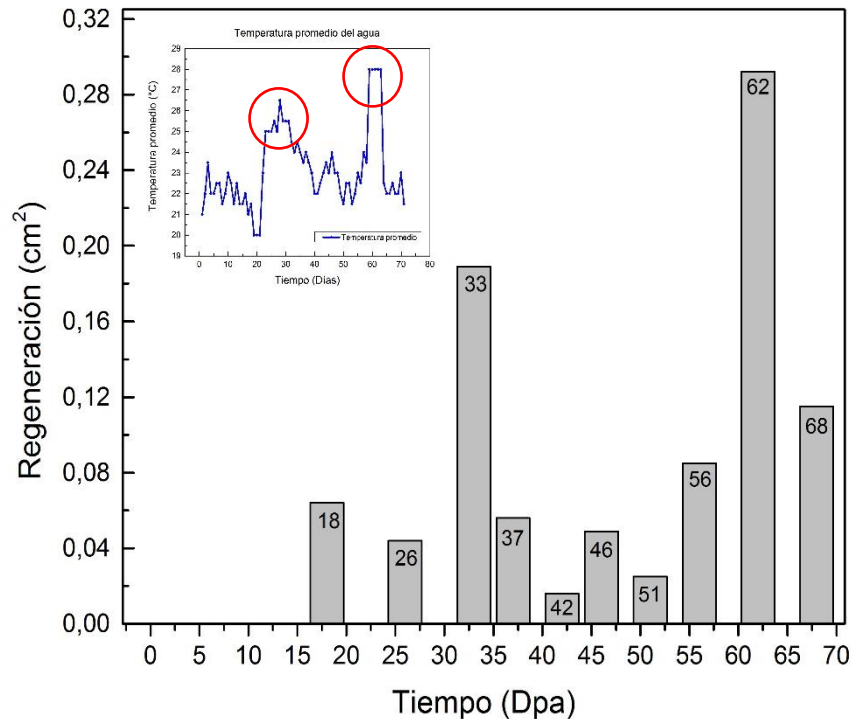


Figura 13. Área regenerada de cada muestra fotográfica. El día documentado con mayor crecimiento se presenta a los 33 dpa muestra el mayor crecimiento de la alca caudal. Parte superior izquierda figura 7 del registro de las temperaturas durante todo el proceso experimental.

Para medir la longitud de crecimiento de los rayos, se tomó un rayo representativo, el rayo más definido e identificable a simple vista (figura 14-B). La figura 14-A muestra el crecimiento de la longitud del rayo respecto al tiempo, es decir, posteriores a la última amputación. La grafica muestra que al igual que el área en la figura 12 el crecimiento del rayo se registró hasta el día 18 dpa.

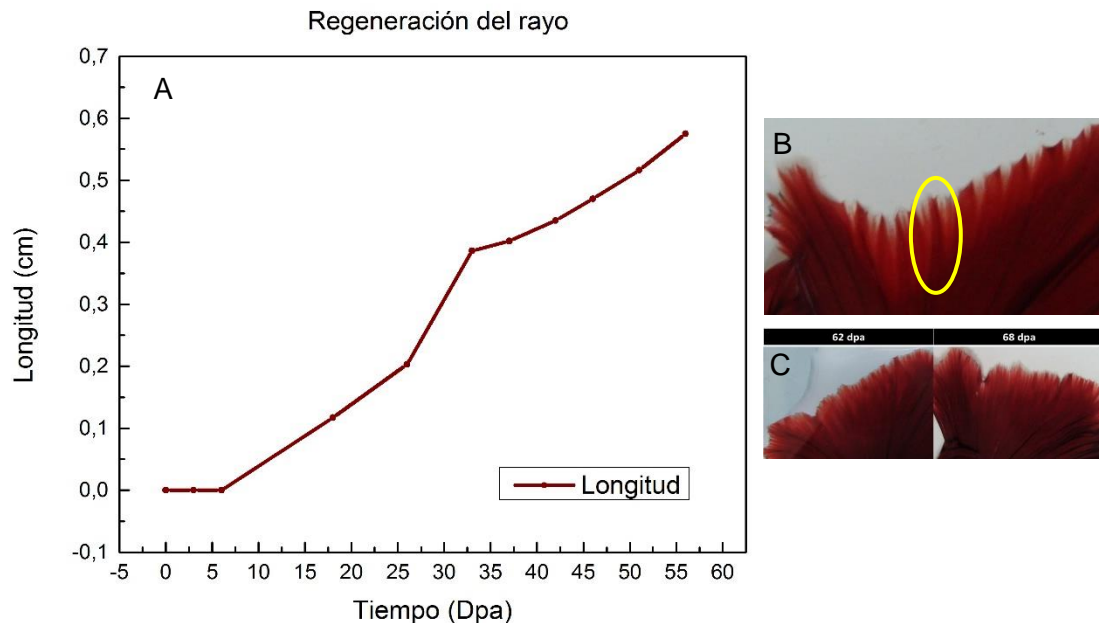


Figura 14. Crecimiento d la longitud del rayo con respecto al tiempo de regeneración. Se muestra el crecimiento del rayo más notorio durante el proceso de regeneración (B), (A) muestra el rayo seleccionado para determinar la longitud de crecimiento de los rayos (rayo seleccionado dentro del círculo amarillo) y (c) muestras los días 62 dpa y 68 dpa donde ya no es posible detectar el rayo medido anteriormente.

En la figura 14, el crecimiento del rayo continúa respecto al tiempo, pero se ve un aumento notable en el punto 33 dpa, esto también puede relacionar con los días previos a este día donde se presentaron las temperaturas más altas. Después del día 56 dpa ya no fue posible registrar el crecimiento del rayo debido a que este ya no fue distinguible por lo que las mediciones del rayo solo se realizaron hasta ese día, figura 14-C.

7.6 Expresión del ligando Wnt10a

Se estandarizó la técnica de PCR transcriptasa reversa para los Wnt10a del pez *B. splendens*. Para ello se realizó RT-PCR a partir del ADN complementario obtenido de los cortes de la aleta caudal a las 0 hpa y 72 hpa, esperando que el corte de la aleta caudal a las 72 hpa exprese el gen *Wnt10a*, que participa en la vía canónica de Wnt implicada en las etapas de la regeneración. Durante la

estandarización, 1 minuto a 72°C (elongación) no se obtuvo ningún producto en ninguno de los dos tiempos (0 hpa y 72 hpa), con ninguna combinación de los 6 cebadores de para el gen *Wnt10a*. Por lo que se probaron diferentes tiempos: 1 minuto 15 segundos, 2 minutos, 2 minutos 15 segundos y 3 minutos. Nuestros resultados muestran la presencia de una banda de aproximadamente 1,000 pb en ambos tiempos (0hpa y 72 hpa) con un tiempo de elongación en el termociclador por 2 minutos 15 segundos a 72°C, con los cebadores FBs1_Want10a y RBs2_Wnt10a. El producto esperado es de 942 bases. Estos resultados no son concluyentes ya que por medio de electroforesis no se puede determinar cambios estructurales o diferencias cuantitativas de expresión para *Wnt10a*.

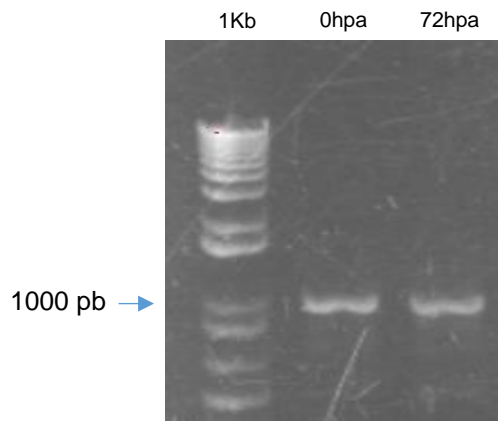


Figure 15. Gel de electroforesis resultante del RT-PCR con los cebadores FBs1_Wnt10a y RBs2_Wnt10a a las 0 hpa y 72 hpa de la aleta caudal de *B. splendens*.

8. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios enfocados en procesos de regeneración de vertebrados se ha centrado en el estudio de la aleta caudal del pez teleosteo modelo *D. rerio*. Sin embargo, en este estudio se ha utilizado a *B. splendens* como un modelo emergente para abordar el papel de la regeneración en vertebrados. Este trabajo es el primer trabajo reportado que plantea aspectos moleculares y con evidencia grafica la regeneración de la aleta caudal en *B. splendens*. Por ende, es el primer acercamiento genético y de evidencia descriptiva de regeneración en *B. splendens*.

Durante el proceso experimental de amputación y registro fotográfico del proceso de regeneración dos de los tres peces enfermaron de micosis, Betta 1 y Betta 3. Por ende, en este proyecto se trabajó únicamente con el pez nombrado Betta 2, debido a que los otros peces (Betta 1 y Betta 3) presentaron enfermedad, Betta 3 se recuperó, mientras que Betta 2 falleció al final del estudio.

Los hongos son uno de los problemas más comunes que tienen que enfrentar los peces en un acuario o vida libre. Los peces son más susceptibles cuando han sufrido algún tipo de daño o lesión principalmente en las aletas (Álvarez-León, 2007; Rocha, 2006). La aparición de infecciones por hongos, bacterias o protozoarios en ocasiones se debe a factores ambientales como desnutrición, heridas, contaminación o por bajas temperaturas (Rocha, 2006). Aunque el agua se cambió y fue acondicionada cada 5 días para evitar el cultivo y crecimiento de algún patógeno no se pudo evitar el desarrollo de enfermedad en dos de los tres peces.

Probablemente la infección se debió a la amputación de la cola, que dejó expuesta una herida oportuna para cualquier patógeno. Otro factor que probablemente pudo determinar que se presentara un proceso infeccioso fueron las temperaturas bajas que, aunque el promedio estuvo en los 23°C, algunos días se presentaron temperaturas entre 20 y 21°C, condiciones consideradas bajas para el pez *B. splendens*. Las mejores condiciones de temperatura para los peces *Betta* está entre temperaturas arriba de los 21°C hasta 30°C, con un ideal de entre 24 °C

a 28°C (Goldstein, 2004; Precht, 1973). Para estudios posteriores en *B. splendens* se recomienda el acondicionamiento de la temperatura con un termostato.

Por otro lado, estudios previos han identificado que temperaturas altas tienen un efecto de aceleración durante el proceso de regeneración de organismos como la planaria, la hydra y el pez cebra (Brøndsted 1961; Peebles, 1898; Pennock et al., 1988). Para ello se ha aplicado el uso de cambios de temperatura para identificar alelos condicionales o de mutaciones sensibles a la temperatura que afecten de algún modo la regeneración. En el pez cebra se ha identificado que la regeneración de la aleta caudal se completa de forma eficaz dentro de un amplio intervalo de temperaturas que van desde los 25°C hasta los 33°C (Johnson y Weston, 1995; Nechiporuk et al., 2003; Pfefferli y Jazwińska, 2015).

En 1995 Johnson y Weston midieron la tasa de crecimiento de la aleta caudal a una temperatura comúnmente usada de 25°C, y a una más alta de 33 °C, observando que la tasa de regeneración en la temperatura a 33°C fue de aproximadamente dos veces la tasa de la regeneración a la temperatura común de 25°C, que alcanza aproximadamente un 50% de la regeneración total a los 6 dpa y que se completaba a las dos semanas. Ellos notaron que, a 33°C el blastema es detectado 1 dpa y que a 25° es identificado hasta los 2 dpa. A la vez, ellos identificaron mutaciones sensibles a la temperatura no letales en el pez cebra, estas mutaciones eran capaces de permitir el crecimiento o la malformación de la aleta caudal (Johnson y Weston, 1995). Al igual que lo reportado para *D. rerio*, se vio que las temperaturas altas aumentaron la regeneración del área amputada de la aleta caudal de *B. splendens*. Durante el proyecto, se observó un efecto de la temperatura sobre la regeneración, ya que en los días previos al registro fotográfico del área regenerada, los 33 dpa y 62 dpa se registraron altas temperaturas y en estos días de la toma de muestra se registraron los mayores aumentos del área regenerada.

Normalmente, a medida que aumenta la temperatura en la que vive un organismos este sufre aumentos de las tasas metabólicas y en los procesos fisiológicos, así que en teoría, las tasas de regeneración de las extremidades como la aleta caudal deben aumentar también (Boominathan and Ferreira, 2012).

Entonces, el efecto que tienen las temperaturas elevadas en el proceso de regeneración es el aumento de la velocidad de los procesos químicos y enzimáticos que ocurren dentro de la herida y el metabolismo de las células y los tejidos que participan en el proceso de reparación (Boominathan y Ferreira, 2012).

La temperatura tiene efectos no solo en procesos regenerativos en peces teleósteos, si no en procesos del desarrollo. Por ejemplo, lo que se sabe del efecto de las temperaturas en *B. splendens* es que se ha visto que a 28°C los machos construyen sus nidos para la puesta de huevos pero no los construyen a temperaturas iguales o menores a 20°C (Precht, 1973). Muchos genes implicados en el proceso de regeneración también tienen participación en el desarrollo ontogenético (Precht, 1973); por lo tanto, la elección de la construcción de nidos a ciertas temperaturas pueda deberse al efecto de la temperatura en procesos esenciales del desarrollo de los alevines (Precht, 1973).

Por lo que es necesario para futuros trabajos enfocados en regeneración el uso de temperaturas constantes de 28° a 30°C y observar los tiempos de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens*, así como identificar mutaciones condicionales y genes involucrados en los procesos de señalización de la regeneración. Y a su vez, el aumento de la temperatura ayudará a obtener tiempos menores a 68 dpa donde casi se completa la regeneración de la aleta caudal.

La visualización y la medición de la longitud del rayo fue documentada desde el 18 dpa hasta el 56 dpa, después de ese día aunque si se logran ver rayos distribuidos en la aleta caudal, no fue posible identificar el rayo utilizado en este trabajo (Figura 8 y 9), probablemente gran parte de la falta de identificación del rayo se debió al poco conocimiento que se tiene sobre los rayos de la aleta caudal de *B. splendens*. Hasta la fecha no existe caracterización que describa la morfología y el número de rayos promedio en *B. splendens*. En 2015 el Club de Betteros Mexicanos y Países de Habla Hispana (CBMX) propone los Estándares de los Rayos del Pez Betta Splendens, que argumenta que para el CBMX el pez *B. splendens*, dependiendo de la raza y la cría selectiva presenta diferentes números de rayos. Esta descripción de los rayos no es un trabajo científico, es una guía específica para

los criadores betteros para la selección de peces de “alta calidad” con el fin de localizar un pez perfecto (CBMX, 2015). Pero con esta guía no fue posible identificar el número de rayos de este pez *B. splendens*, además, la resolución de la cámara y el fenotipo color rojo hizo que los rayos no fueran tan visibles a simple vista, por lo que no fue posible identificar los rayos.

El aceite de clavo, se utilizó como alternativa a la tricaina metanosulfato MS22, debido a que el aceite es de bajo costo y de fácil acceso en cualquier farmacia. El aceite de clavo es un producto natural, actualmente usado en medicina y odontología (Grush et al., 2004; Murgas et al., 2010). El aceite de clavo resulta de la destilación de las hojas, flores y tallos de la planta *Syzygium aromaticum*. El principio activo de este aceite es el eugenol (4-alil-2-metoxifenol), presente en concentraciones que oscilan entre el 70 y 95% de la composición total del aceite de clavo (Briozzo et al., 1989)

Los tiempos de anestesia para *B. splendens* cuando no presentaron movimientos operculares visibles fue de 5 minutos con 40 segundos con un error estándar de ± 34 segundos. La recuperación del efecto anestésico con el completo eje de nado presento un promedio de 15 minutos con un error estándar de ± 4.7 minutos. La concentración usada para *B. splendens* se basó en lo reportados para ya que según el estudio de los efectos anestésicos para *D. rerio* realizado por Grush et al (2004), recomiendan entre 60 a 100 μL de aceite de clavo y el tiempo para inducir anestesia completa anestesia hasta que el pez sufrió la pérdida de actividad de reflejo fue de entre 6 y 12 minutos a esas preparaciones del aceite de clavo. Y el tiempo de recuperación fue medido cuando ese reaccionaba al estímulo, el promedio de recuperación fue de aproximadamente 10 minutos (Grush et al., 2004).

D. rerio al momento de ser introducido a la solución anestésica con aceite de clavo estos presentaron nados rápidos y reflejos de regurgitación (Grush et al., 2004), similares a los reportados en este trabajo. Otro estudio de efecto anestésico del aceite de clavo en pez escalar, *Pterophyllum scalare*, al ser introducido a la solución de aceite de clavo inmediatamente presento episodios de nado rápido y de corta distancia por periodos cortos de tiempo. Mientras que durante el tiempo de

recuperación a la anestesia la explosividad de nado no se evidenció (Millán-Ocampo et al., 2012). La concentración usada en este estudio resultó ser eficaz ya que se llevó una buena manipulación sin reacción a la manipulación de *B. splendens*, siempre y cuando el pez estuviera sin movimientos operculares. En dos ocasiones se reportó la reacción del pez a la amputación de la aleta caudal, porque al parecer, el pez se sacó de la solución anestésica cuando aún los movimientos operculares eran visibles. Y comparado con el efecto que sufren los peces en otros estudios reportados, estos al ser introducidos al anestésico de aceite de clavo las reacciones se asemejan a las reportadas en este trabajo con *B. splendens*.

La señalización de la vía Wnt/ β -catenina está implicada en regular el destino y proliferación de células progenitoras durante el desarrollo y la homeostasis de los tejidos adultos, pero también, esta vía participa en la función de células progenitoras durante la regeneración de tipo epimórfica (Narita et al., 2005; Stoick-Cooper et al., 2006). Muchos ligandos de Wnt han sido identificados como activadores de la vía Wnt/ β -catenina. Por ejemplo, en un trabajo realizado en 2007, se investigó cuales ligandos de Wnt podrían ser los responsables de la activación de la señalización de la vía Wnt/ β -catenina durante la regeneración de la aleta caudal en *D. rerio*. Ellos reportaron que *wnt10a* se expresa temprano durante la regeneración detectándose en la punta distal del blastema, usando la técnica de PCR cuantitativa, encontraron que la expresión de *Wnt10a* aumentaba durante la regeneración, y que eran mayores sus niveles de expresión que en las aletas sin cortar (Stoick-Cooper et al., 2006).

En este proyecto se investigó la expresión de un gen que como se mencionó ya ha sido previamente identificado en la regeneración de la aleta caudal de *D. rerio*, *Wnt10a*. Para ello, se diseñaron para *B. splendens* cebadores degenerados y se estandarizó la técnica de RT-PCR con esos cebadores. La estandarización de RT-PCR con *Wnt10a* servirá para futuras investigaciones en las que se necesite medir la expresión de *Wnt10a* en procesos de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens*. La mayoría de los experimentos enfocados en elucidar la participación de genes que actúan en las vías de señalización en regeneración de la aleta caudal

se enfocan en el uso de PCR tiempo real (Bouzaffour et al., 2009; Poss et al., 2000b; Stoick-Cooper et al., 2006), para medir niveles de expresión genéticos involucrados en el proceso de regeneración. En este proyecto solo se utilizó RT-PCR para identificar genes de los cortes a las 0 hpa y 72 hpa, pero para futuras investigaciones se recomienda usar PCR tiempo real, que permita cuantificar de forma absoluta el producto de amplificación y observar diferencias en la expresión genética debido a la formación de blastema y diferenciación celular debido a los procesos de regeneración. En este trabajo no se pudo determinar si hubo un aumento en los niveles de expresión de *wnt10a*.

Otra limitante de este proyecto fue el uso de una cámara con 12.1 mega píxeles, y se necesita una mayor resolución ya que durante la observación de la regeneración durante la primera semana a ojo humano se observaba una pequeña capa blanquecina en la zona donde ocurrió la amputación ya que aunque siempre fue identificada por el ojo humano, esta solo se logró apreciar en la figura 8 (fotografía tomada a los 46 dpa). Por lo que se recomienda el uso de cámaras más sofisticadas que puedan darnos la resolución óptima para poder distinguir a detalle los procesos fenotípicos que nos ayuden a describir el proceso de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens*.

Es necesaria la futura aplicación de herramientas genéticas y químicas para demostrar que se requieren varias vías de señalización canónica para la formación y función blastema, excrecencia regenerativa y la completa formación de la aleta caudal del pez *B. splendens*.

9. CONCLUSIÓN

Este proyecto es uno de los pocos estudios hechos a nivel genético y el primero en regeneración en *B. splendens*. A pesar de ser *Betta* un pez teleosteo con capacidad regenerativa, hemos confirmado y documentado fotográficamente por primera vez la regeneración de la aleta caudal.

Durante la regeneración de *B. splendens* siempre presento una pigmentación rojiza en los rayos e interrayos, además de que fueron fácilmente distinguibles, aun sin el uso de cámara. El proceso de regeneración casi se completó a los 68 dpa a una temperatura promedio de 23°C.

Durante el proceso experimental se observó la elevación de la temperatura en dos periodos del tiempo: en el primero se registraron los días más calurosos entre los días 23 y 31 entre los 25 y 26.5°C; el segundo período se debió a un aumento con termostato entre los días 59 y 63 a 28°C. Los resultados muestran que las altas temperaturas favorecieron el crecimiento del área regenerada de la aleta caudal. El crecimiento de un rayo representativo parecía presentar correlación con el área regenerada mostrando patrones de crecimiento similares, pero después de los días 62 y 68 dpa el rayo ya no fue distinguible.

Durante la estandarización de la técnica de RT-PCR se logró obtener una banda de 1,000 pb a las 0 y 72 hpa, promedio esperado de la banda. La estandarización de RT-PCR con *Wnt10a* servirá para futuras investigaciones en las que se necesite medir la expresión de *Wnt10a* en procesos de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens*.

Durante el proyecto se identificaron varias características de la aleta caudal del pez *B. splendens* que lo hacen ideal para procedimientos experimentales y de estudios de regeneración. El pequeño tamaño de *B. splendens* lo hizo un modelo de fácil alojamiento y manipulación en laboratorio. Además, posee una aleta caudal que en contraste con las aletas restantes es la aleta más grande y que incluso puede alcanzar la misma longitud que la de su cuerpo y al encontrarse en los extremos posteriores la aleta caudal fue un apéndice accesible y fácil para realizar las amputaciones, observaciones y la captura de imágenes.

Por otra parte, el proceso de regeneración es visible a simple vista, ya que se puede distinguir la formación de los rayos óseos, proceso que cuesta trabajo distinguir en el pez modelo *D. rerio* ya que posee una aleta caudal que puede alcanzar los 8 mm de largo (Plaut, 2000). Estas notables características ponen a la aleta caudal de *B. splendens* como un modelo ideal para hacer frente a cuestiones fundamentales de regeneración de órganos de vertebrados.

De manera general, este estudio contribuye a establecer las bases de regeneración de la aleta caudal de *B. splendens* y a su vez, es propuesto como un modelo valioso para comprender los mecanismos genéticos y descriptivos de regeneración de la aleta caudal.

11. BIBLIOGRAFÍA

Akimenko, M.A., Johnson, S.L., Westerfield, M., and Ekker, M. (1995). Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development* 121, 347–357.

Akimenko, M.-A., Marí-Beffa, M., Becerra, J., and Géraudie, J. (2003). Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev. Dyn.* 226, 190–201.

Álvarez-León, R. (2007). asociaciones y patologías en los peces dulceacuícolas, estuarinos y marinos de Colombia: aguas libres y controladas. *Bol. Mus. Hist. Nat.* 11, 81–129.

Alves, L.G. (2008). Efecto de la especie y color de los oponentes en la agresividad de los machos de *Betta splendens* (Regan, 1910).

Azevedo, A.S., and Saúde, L. (2011). The Regenerative Capacity of the Zebrafish Caudal Fin Is Not Affected by Repeated Amputations. *PLoS ONE* 6.

Azevedo, A.S., Sousa, S., Jacinto, A., and others (2012). An amputation resets positional information to a proximal identity in the regenerating zebrafish caudal fin. *BMC Dev. Biol.* 12, 24.

Becker, C.G. (2004). L1.1 Is Involved in Spinal Cord Regeneration in Adult Zebrafish. *J. Neurosci.* 24, 7837–7842.

Becker, C.G., and Becker, T. (2002). Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulfate glycosaminoglycans in zebrafish. *J. Neurosci.* 22, 842–853.

Bereiter-Hahn, J., and Zylberberg, L. (1993). Regeneration of teleost fish scale. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 105A, 625–641.

Bernhardt, R.R., Tongiorgi, E., Anzini, P., and Schachner, M. (1996). Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic

pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 376, 253–264.

Boominathan, V.P., and Ferreira, T.L. (2012). Factors Promoting Increased Rate of Tissue Regeneration: The Zebrafish Fin as a Tool for Examining Tissue Engineering Design Concepts. *Zebrafish* 9, 207–219.

Bouzaffour, M., Dufourcq, P., Lecaudey, V., Haas, P., and Vríz, S. (2009). Fgf and Sdf-1 Pathways Interact during Zebrafish Fin Regeneration. *PLoS ONE* 4, e5824.

Braddock, J.C., and Braddock, Z.I. (1959). The development of nesting behaviour in the siamese fighting fish *Betta splendens*. *Anim. Behav.* 7, 222–232.

Briozzo, J., Núñez, L., Chirife, J., Herszage, L., and D'aquino, M. (1989). Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 69–75.

Brøndsted, H.V., and others (1961). Influence of temperature on rate of regeneration in the time-graded regeneration field in planarians. *Development* 9, 159–166.

CBMX, C. de B.M. y P. de H.H. (2015). Estándares de los Rayos del Pez *Betta Splendens*.

Chen, X., Yang, J., Evans, P.M., and Liu, C. (2008). Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40, 577–594.

De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 43, 745–756.

Durán, I., Marí-Beffa, M., Santamaría, J.A., Becerra, J., and Santos-Ruiz, L. (2011). *Actinotrichia collagens* and their role in fin formation. *Dev. Biol.* 354, 160–172.

Elgar, G. (1996). Quality not quantity: the pufferfish genome. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1437–1442.

Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., and Poss, K.D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet. TIG* 29, 10.1016/j.tig.2013.07.003.

Goldstein, R.J. (2004). *The Betta Handbook (Barron's Pet Handbooks)* (New York: Barron's).

Groth, W.O. (1970). *Embryology of the Siamese Fighting Fish, Betta Splendens*. Drake University.

Grush, J., Noakes, D.L.G., and Moccia, R.D. (2004). The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish* 1, 46–53.

Hargrove, M., and Hargrove, M. (1999). *The Betta: An Owner's Guide to a Happy Healthy Fish (Happy Healthy Pet)* (New York: Wiley Publishing, Inc).

Henry, J.J., and Tsonis, P.A. (2010). Molecular and Cellular Aspects of Amphibian Lens Regeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 543–555.

Hess, E.H. (1952). Temperature as a Regulator of the Attack-Response of *Betta splendens*. *Z. Für Tierpsychol.* 9, 379–382.

Hinostroza, E., and Serrano-Martínez, E. (2013). Efecto anestésico del metasulfonato de triclaína en paiches (*Arapaima gigas*) juveniles. *Rev. Investig. Vet. Perú* 24, 451–458.

Huang, C., Lawson, N.D., Weinstein, B.M., and Johnson, S.L. (2003). *reg6* is required for branching morphogenesis during blood vessel regeneration in zebrafish caudal fins. *Dev. Biol.* 264, 263–274.

Iovine, M.K. (2007). Conserved mechanisms regulate outgrowth in zebrafish fins. *Nat Chem Biol* 3, 613–618.

Jiménez, I.J.D. (2009). Modelos de regeneración. *Encuentros En Biol.* 2, 1.

Johnson, S.L., and Weston, J.A. (1995). Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in Zebrafish fin regeneration. *Genetics* 141, 1583–1595.

Jovel, C.D.A. (2000). Experiencia en la reproducción de la carpa Koi (*Cyprinus carpio*) y el pez Betta (*Betta splendens*).

Kawakami, Y., Rodriguez Esteban, C., Raya, M., Kawakami, H., Marti, M., Dubova, I., and Izpisua Belmonte, J.C. (2006). Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev.* 20, 3232–3237.

Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68–75.

Kowasupat, C., and Jeethong, T. (2012). *Betta siamorientalis*, a new species of bubble-nest building fighting fish (Teleostei: Osphronemidae) from eastern Thailand. *Vertebr Zool* 387–397.

Kowasupat, C., Panijpan, B., Laosinchai, P., Ruenwongsa, P., Phongdara, A., Wanna, W., Senapin, S., and Phiwsaiya, K. (2014). Biodiversity of the *Betta smaragdina* (Teleostei: Perciformes) in the northeast region of Thailand as determined by mitochondrial COI and nuclear ITS1 gene sequences. *Meta Gene* 2, 83–95.

Latia, H., and Aparicio, G. (2005). 100 peces argentinos (Buenos Aires, Argentina: Albatros).

Lindsay, S.M. (2010). Frequency of Injury and the Ecology of Regeneration in Marine Benthic Invertebrates. *Integr. Comp. Biol.* 50, 479–493.

Llanos, C., Monteza, C., and Scotto, C. (2012). Determinación de la concentración letal media (CL50) y eficacia del eugenol como anestésico sobre *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Rev. Investig. Vet. Perú* 23, 429–440.

López-Schier, H., and Hudspeth, A.J. (2006). A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 18615–18620.

Lucas, G.A. (1968). A study of variation in the Siamese Fighting Fish, *Betta splendens*, with emphasis on color mutants and the problem of sex determination.

Mabee, P.M., and Trendler, T.A. (1996). Development of the cranium and paired fins in *Betta splendens* (Teleostei: Percomorpha): Intraspecific variation and interspecific comparisons. *J. Morphol.* *227*, 249–287.

Many, A.M., and Brown, A.M.C. (2014). Both Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Independently Promote Stem Cell Growth in Mammospheres. *PLoS ONE* *9*, e101800.

Marrone, R.L., Pray, S.L., and Bridges, C.C. (1966). Norepinephrine elicitation of aggressive display responses in *Betta splendens*. *Psychon. Sci.* *5*, 207–208.

Millán-Ocampo, L., Torres-Cortés, A., Marín-Méndez, G.A., Ramírez-Duart, W., Vásquez-Piñeros, M.A., and Schroniltgen Rondón-Barragán, I. (2012). CONCENTRACIÓN ANESTÉSICA DEL EUGENOL EN PECES ESCALARES (PTEROPHYLLUM SCALARE). *Rev. Investig. Vet. Perú* *23*, 171–181.

Monvises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanothai, N., and Panijpan, B. (2009). The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. *ScienceAsia* *35*, 8–16.

Moody, A.C., and Smith, K. (1956). Schizophrenia and the Siamese fighting fish. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* *10*, 327.

Morgan, T.H. (1900). Regeneration in teleosts. *Dev. Genes Evol.* *10*, 120–134.

Moriyama, Y., and Takeda, H. (2013). Evolution and development of the homocercal caudal fin in teleosts. *Dev. Growth Differ.* *55*, 687–698.

Murgas, L.D.S., Ribeiro, P.A.P., Costa, L.S., Eloy, Â.A., Vieira, P., and others (2010). Aceite de clavo como anestésico para el pez pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In *Anales de Veterinaria de Murcia*, pp. 69–76.

Nabrit, S.M. (1929). The Rôle of the Fin Rays in the Regeneration in the Tail-Fins of Fishes. (In *Fundulus* and Goldfish). *Biol. Bull.* 56, 235–266.

Nechiporuk, A., Poss, K.D., Johnson, S.L., and Keating, M.T. (2003). Positional cloning of a temperature-sensitive mutant emmental reveals a role for *sly1* during cell proliferation in zebrafish fin regeneration. *Dev. Biol.* 258, 291–306.

Newmark, P.A., and Sánchez, A. (1997). Publications-Bioessays-1997. *Bioessays* 19, 535.

Ninov, N., and Yun, M.H. (2015). Current advances in tissue repair and regeneration: the future is bright. *Regeneration* 2, 84–91.

Ochoa-Hernández, A.B., Juárez-Vázquez, C.I., Rosales-Reynoso, M.A., and Barros-Núñez, P. (2012). La vía de señalización Wnt- β -catenina y su relación con cáncer. *Cir Cir* 80, 389–398.

Peebles, F. (1898). The Effect of Temperature on the Regeneration of Hydra. *Zool. Bull.* 2, 125–128.

Pennock, D.G., Thatcher, T., and Gorovsky, M.A. (1988). A temperature-sensitive mutation affecting cilia regeneration, nuclear development, and the cell cycle of *Tetrahymena thermophila* is rescued by cytoplasmic exchange. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2681–2689.

Pfefferli, C., and Jaźwińska, A. (2015). The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration* 2, 72–83.

Plaut, I. (2000). Effects of fin size on swimming performance, swimming behaviour and routine activity of zebrafish *Danio rerio*. *J. Exp. Biol.* 203, 813–820.

Port, F., and Basler, K. (2010). Wnt Trafficking: New Insights into Wnt Maturation, Secretion and Spreading. *Traffic* 11, 1265–1271.

Poss, K.D., Shen, J., and Keating, M.T. (2000a). Induction of *lef1* during zebrafish fin regeneration. *Dev. Dyn.* 219, 282–286.

Poss, K.D., Shen, J., and Keating, M.T. (2000b). Induction of *lef1* during zebrafish fin regeneration. *Dev. Dyn.* 219, 282–286.

Poss, K.D., Keating, M.T., and Nechiporuk, A. (2003). Tales of regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.* 226, 202–210.

Precht, H. (1973). *Temperature and Life* (New York: Springer).

Rainboth, W.J. (1996). *Fishes of the Cambodian Mekong* (Rome: FAO).

Raya, Á., Consiglio, A., Kawakami, Y., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua-Belmonte, J.C. (2004). The zebrafish as a model of heart regeneration. *Cloning Stem Cells* 6, 345–351.

Rocha, G., Rosa del Carmen (2006). *Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero II* (Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Romero, M.M.G. *Vías moleculares involucradas durante la regeneración de la estructura caudal del pez cebra.*

Rudiger Riehl, and Hans A. Baensch (1996). *Aquarium Atlas* (Germany: Mergus).

Sadler, K.C., Krahn, K.N., Gaur, N.A., and Ukomadu, C. (2007). Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, *uhf1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1570–1575.

Saito-Diaz, K., CHEN, T.W., WANG, X., THORNE, C.A., WALLACE, H.A., PAGE-MCCAW, A., and LEE, E. (2013). The way Wnt works: Components and mechanism. *Growth Factors Chur Switz.* 31, 1–31.

Santamaria, J.A., and Becerra, J. (1991). Tail fin regeneration in teleosts: cell-extracellular matrix interaction in blastemal differentiation. *J. Anat.* 176, 9.

Santos-Ruiz, L., Santamaría, J.A., Ruiz-Sánchez, J., and Becerra, J. (2002). Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. *Dev. Dyn.* 223, 262–272.

Schindler, I., and Linke, H. (2013). *Betta hendra*—a new species of fighting fish (Teleostei: Osphronemidae) from Kalimantan Tengah (Borneo, Indonesia). *Vertebr Zool* 63, 35–40.

Schindler, I., and Schmidt, J. (2006). Review of the mouthbrooding *Betta* (Teleostei, Osphronemidae) from Thailand, with descriptions of two new species. *Z. Für Fisch.* 8, 47–69.

Shah, M.V., Namigai, E.K.O., and Suzuki, Y. (2011). The role of canonical Wnt signaling in leg regeneration and metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Mech. Dev.* 128, 342–358.

Simpson, M.J.A. (1968). The Display of the Siamese Fighting Fish, *Betta splendens*. *Anim. Behav. Monogr.* 1, 71.

Sousa, S., Afonso, N., Bensimon-Brito, A., Fonseca, M., Simoes, M., Leon, J., Roehl, H., Cancela, M.L., and Jacinto, A. (2011). Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development* 138, 3897–3905.

Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Riehle, K.J., Hubbert, C., Major, M.B., Fausto, N., and Moon, R.T. (2006). Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 134, 479–489.

Stoick-Cooper, C.L., Moon, R.T., and Weidinger, G. (2007). Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev.* 21, 1292–1315.

Tal, T.L., Franzosa, J.A., and Tanguay, R.L. (2010). Molecular Signaling Networks That Choreograph Epimorphic Fin Regeneration in Zebrafish – A Mini-Review. *Gerontology* 56, 231–240.

Tan, H.H. (2005). The fighting fishes (Teleostei : Osphronemidae : genus *Betta*) of Singapore, Malaysia and Brunei. *Raffles Bull. Zool.* 43–99.

Tsonis, P.A. (2000). Regeneration in Vertebrates. *Dev. Biol.* 221, 273–284.

Umrath, K. (1939). Über die Vererbung der Farben und des Geschlechts beim Schleierkampffisch, *Betta splendens*. *Z. Für Indukt. Abstamm.- Vererbungslehre* 77, 450–454.

Venkatesh, B., Gilligan, P., and Brenner, S. (2000). Fugu: a compact vertebrate reference genome. *Birm. Issue* 476, 3–7.

Wallbrunn, H.M. (1958). Genetics of the Siamese Fighting Fish, *Betta Splendens*. *Genetics* 43, 289–298.

Wehner, D., Cizelsky, W., Vasudevaro, M.D., Özhan, G., Haase, C., Kagermeier-Schenk, B., Röder, A., Dorsky, R.I., Moro, E., Argenton, F., et al. (2014). Wnt/ β -Catenin Signaling Defines Organizing Centers that Orchestrate Growth and Differentiation of the Regenerating Zebrafish Caudal Fin. *Cell Rep.* 6, 467–481.

Witte, K., and Schmidt, J. (1992). *Betta brownorum*, a new species of anabantoids (Teleostei: Belontiidae) from northwestern Borneo, with a key to the genus. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 305–330.

