

INFLUENCIA DE SUERO FETAL BOVINO Y AMINOÁCIDOS EN LA REGENERACIÓN DE EXTREMIDADES EN LA RANA AFRICANA DE UÑAS (*Xenopus laevis*)

INFLUENCE OF FETAL BOVINE SERUM AND AMINO ACIDS ON LIMB REGENERATION IN THE AFRICAN CLAWED FROG (*Xenopus laevis*)

Giovanni HERRERA-SANDOVAL¹; Fernando ALONZO-ROJO¹; Jorge SÁENZ-MATA¹; Cristo Omar PUENTE-VALENZUELA¹; David Ramiro AGUILLÓN-GUTIÉRREZ^{2*}

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Universidad S/N, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México. C.P. 35010.

²Laboratorio de Bioindicadores, Centro de Investigación y Jardín Etnobiológico, Universidad Autónoma de Coahuila. Dr. Francisco González 37, Viesca, Coahuila, México. C.P. 27480.

*e-mail: david_aguillon@uadec.edu.mx

RESUMEN.

La regeneración biológica es la capacidad que poseen ciertos organismos para restaurar algún tejido perdido o lesionado. Se han utilizado diversos modelos biológicos para el estudio de la regeneración como las hidras (*Hydra viridis*), las planarias (*Planaria maculata*, *P. lugubris*) y los anfibios (*Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*). En este trabajo se investigó la influencia del suero fetal bovino y aminoácidos en la regeneración de extremidades en la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*). Se estudiaron 40 especímenes en estadio 66 a los cuales se les realizó una amputación en el área proximal de la tibia-peroné de la extremidad posterior derecha, formando cinco grupos (tratamientos) (aminoácidos, suero fetal bovino, solución fisiológica, estimulación mecánica y control) que estuvieron en fase experimental por un lapso de 78 días. Se realizaron análisis morfométricos y de mortalidad. Los resultados mostraron que no existe una diferencia significativa respecto al ancho y largo de la espícula bajo la influencia de estos tratamientos. La mortalidad fue mayor en el grupo donde se aplicó suero fetal bovino y menor en el grupo que recibió aminoácidos. Probablemente la capacidad regenerativa en el estadio 66 está más influida por el sitio de amputación que por los tratamientos.

Palabras Clave: Suero, aminoácidos, regeneración, extremidades, *Xenopus*

ABSTRACT.

Biological regeneration is the capacity that certain organisms have to restore any lost or injured tissue. Regeneration has been studied in diverse biological models, for example the hydra (*Hydra viridis*), planarian (*Planaria maculata*, *P. lugubris*), and amphibians (*Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*). In this work, the influence of fetal bovine serum and amino acids in limb regeneration in African clawed frog (*Xenopus laevis*) was investigated. Forty specimens were studied on stage 66 which underwent an amputation in the proximal tibia-fibula area of the right hind limb, forming five groups (treatments) (amino acids, fetal bovine serum, application of physiological serum, mechanical stimulation and control) that were in experimental phase for a period of 78 days. Mortality and morphometric analysis were performed. The results showed no significant difference from the width and length of the spike under the influence of these treatments. Mortality was higher in the group where fetal bovine serum was applied and lower in the group receiving amino acids. It is believed that the regenerative capacity in the stage 66 is more influenced by the amputation site than the treatments.

Keywords: Serum, amino acids, regeneration, limbs, *Xenopus*

INTRODUCCIÓN

Lo que conocemos como la regeneración biológica se ha definido tradicionalmente como la capacidad que poseen ciertos organismos vivos para restaurar algún tejido perdido o lesionado o de hacer crecer nuevamente una parte del cuerpo que se perdió por causa accidental o fisiológica (1,2,3). Pero para poder entender la regeneración debemos ver las diferencias entre la regeneración y la reparación. La reparación es un proceso en el cual se sustituye el tejido dañado o perdido por otro, pero no mantiene su identidad estructural ni funcional, en cambio, en la regeneración se conserva la estructura y funcionalidad del tejido original (4).

En la regeneración biológica hay dos mecanismos a resaltar, la morfálaxis y la epimorfosis, este último se refiere a la restauración morfológica y funcional de un tejido o estructura anatómica perdida en un adulto mediante la formación de blastema, y es el mecanismo correspondiente a la regeneración de extremidades en anfibios (4).

Inicialmente el proceso para restaurar el daño ocurre en la epidermis que se encuentra alrededor de la herida, por lo cual la epidermis comienza a recubrir el área afectada. El tiempo en el que esto ocurre es muy rápido pues se efectúa en un lapso de dos a tres días. La segunda etapa del proceso ocurre cuando la epidermis que cubrió la herida comienza a inflamarse hacia afuera creando una estructura temporal llamada blastema en la que se concentran las células para completar todo el proceso regenerativo (2,3,5,6,7). Tradicionalmente se han utilizado diversos modelos biológicos para el estudio de la regeneración, por ejemplo, las hidras (*Hydra viridis*), las planarias (*Planaria maculata*, *P. lugubris*) y los anfibios (*Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*) (1,2,8).

Se sabe que la regeneración es una capacidad evolutiva, y que las condiciones que la propician son particulares en cada especie. Se han identificado productos como el ácido retinoico, factores de crecimiento (GF) y proteínas que estimulan este proceso en vertebrados. En el caso de los GF son importantes

para algunos procesos biológicos como, por ejemplo, el FGF-10 (factor de crecimiento de fibroblastos) estimula la regeneración de extremidades en *X. laevis* (9). También Mullen et al. (10,27) mencionan que los FGF o cualquier otra molécula relacionada a FGF es o bien el agente neurotrópico de la regeneración o la vía de la función, por la que los nervios ejercen su efecto sobre la regeneración. Otro caso fue el estudio de Tanaka y Gann (11) donde realizaron una investigación de implantación de perlas empapadas con ácido retinoico para promover el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), ya que el ácido retinoico juega un papel importante tanto en la desdiferenciación de las células para formar el blastema de regeneración y en los procesos de re-especificación (12). Por otro lado, existen algunas proteínas importantes en la regeneración de musculo, hueso y nervios, como es el caso de la transferrina, ya que dicha proteína es una de las primeras sustancias requeridas para las células de blastema (13,14).

En este trabajo se pretende saber si los aminoácidos y el suero fetal bovino estimulan la regeneración de extremidades en anfibios anuros como la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*), ya que esta especie es un organismo modelo muy importante utilizado para estudiar la embriología de los vertebrados, incluyendo procesos regenerativos, biología celular, fisiología, toxicología y bioquímica. *Xenopus laevis* es adecuada para el laboratorio ya que son resistentes, de larga vida y además pueden ser inducidas a producir huevos de una forma muy controlada y durante todo el año. En etapa embrionaria toleran una extensa manipulación, por ejemplo, de células individuales, disecciones de capas germinales o trasplantes de tejidos, además, su larva es trasparente y relativamente grande (15).

Actualmente la biología y medicina regenerativa son prioritarias debido al tipo de enfermedades que aquejan a la sociedad, por lo tanto, es de mucha importancia realizar estudios de regeneración en los distintos tipos de modelos biológicos, ya que esto conlleva a un mejor entendimiento de dicho proceso para posteriormente

poder utilizarlo en personas y lograr una recuperación de una extremidad o de algún tejido u órgano dañado.

METODOLOGÍA

Condiciones experimentales

Se realizó un experimento en el Laboratorio de Vertebrados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, en México, para evaluar la capacidad regenerativa en la región proximal de la tibia-peroné (zeugopodio) de la extremidad posterior derecha de *Xenopus laevis* variedad albina estadio 66 (16). Se realizó la amputación en la extremidad posterior debido a que las extremidades anteriores son utilizadas en funciones vitales para el animal como son alimentación y reproducción (17).

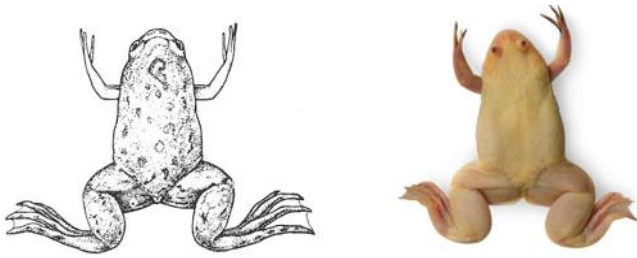


Figura 1: *Xenopus laevis* variedad albina.

Se utilizaron 40 ranas africanas de uñas (*Xenopus laevis*) obtenidas de una comercializadora en la ciudad de Monterrey, México, las cuales se colocaron en acuarios con capacidad de 40 litros con 20 litros de agua (8 individuos por acuario), ya que según Detlaf y Rudneva (18) cada organismo necesita aproximadamente de dos a tres litros de agua para permitirles nadar adecuadamente. Los organismos se alimentaron tres veces por semana con hojuela para peces y camarones secos. A las peceras se les cambió el agua los mismos días de la alimentación para evitar la formación de hongos y bacterias en el acuario, basándose en la metodología propuesta por Detlaf y Rudneva (18).

Amputación de la extremidad

En la etapa experimental se realizó una amputación en la región proximal de la tibia-peroné de la extremidad posterior derecha de *Xenopus laevis*, ya que dichos organismos tienen la capacidad regenerativa incompleta en sus extremidades en etapa adulta y una regeneración completa en estados larvarios, por lo que se buscó analizar este proceso con diferentes tipos de tratamientos por cada grupo. La amputación se realizó con medidas de seguridad para que el organismo sufriera lo menos posible al momento de realizar la amputación. Lo primero que se hizo antes de pasar a la amputación fue colocar a los organismos en una caja Petri con hielo para bajar el metabolismo del individuo y evitar movimientos bruscos al momento de amputar. En la misma caja Petri se agregó la anestesia: 0,3% de MS-222 (Metanosulfonato de tricaina $C_{10}H_{15}NO_5S$), para minimizar el dolor al espécimen. El corte se hizo de una manera perpendicular al eje próximo-distal de la extremidad con la utilización de un bisturí (Figura 2A). Después de hacer la amputación se administró un antibiótico y un antiséptico (gentamicina en agua, 1,3 mg/L y azul de metileno, 4 mg/L) (19) a los cinco acuarios, los cuales se combinan con el agua para evitar infección en el organismo, posteriormente se dejó en reposo a los individuos tres días para permitir que pierdan el estrés obtenido por el daño al que fueron sometidos.

Tratamientos

Luego de la etapa de amputación se inyectaron diferentes tratamientos a cada grupo (Figura 2B). En el grupo 1 se realizó una inyección de suero fetal bovino (SFB) (0,04 ml) (Merck, 500 ml), en el grupo 2 una inyección de producto comercial con aminoácidos (AA) (0,04 ml) (Amino, 1L), en el grupo 3 una inyección de solución fisiológica (SF) (0,04 ml) (Pisa, Cloruro de sodio 0.9 g, 500 ml), en el grupo 4 se realizó una estimulación mecánica (EM) (pinchazo con aguja, simulación de inyección) y en el grupo 5 no se aplicó ningún tipo de

estimulación (C). Las aplicaciones de los tratamientos se realizaron tres veces a la semana (lunes, martes, miércoles) del 28 de septiembre hasta el 14 de diciembre de 2015, siendo un total de 78 días, de los cuales 34 fueron de tratamiento.

Análisis morfométricos

Luego de los dos meses y medio, periodo en que la espícula ya había crecido (Figura 2C), se continuó con análisis morfométricos de las espículas en cada individuo. Para evaluar cada organismo se utilizó un estereoscopio con cámara para fotografiar las espículas, las cuales posteriormente se midieron mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos); para llevar a cabo la medición de la longitud se tomó en cuenta la espícula desde la región proximal de la tibia-peroné (zeugopodio), hasta la parte más distal de la estructura, en el caso del ancho se midió justamente

donde comienza a regenerar la espícula (región proximal del corte) (Figura 2D).

Análisis estadísticos

Una vez obtenidos nuestros datos, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (MedCalc versión 13.0.6.0, 2014). Igualmente se realizó un análisis estadístico mediante las pruebas de coeficiente de correlación de Pearson, Kendall y Spearman, para conocer si existe una relación entre la longitud y el ancho de las espículas de toda la población experimental (PASW Statistics 18 versión 18.0.0, 2009) (32).

Además de los análisis morfométricos, se midió el índice de mortalidad por grupo (SFB, AA, SF, EM y C) en porcentajes. Para este análisis se consideraron aquellos individuos que perecieron durante la etapa experimental (desde la amputación hasta el último día de aplicación de los tratamientos).

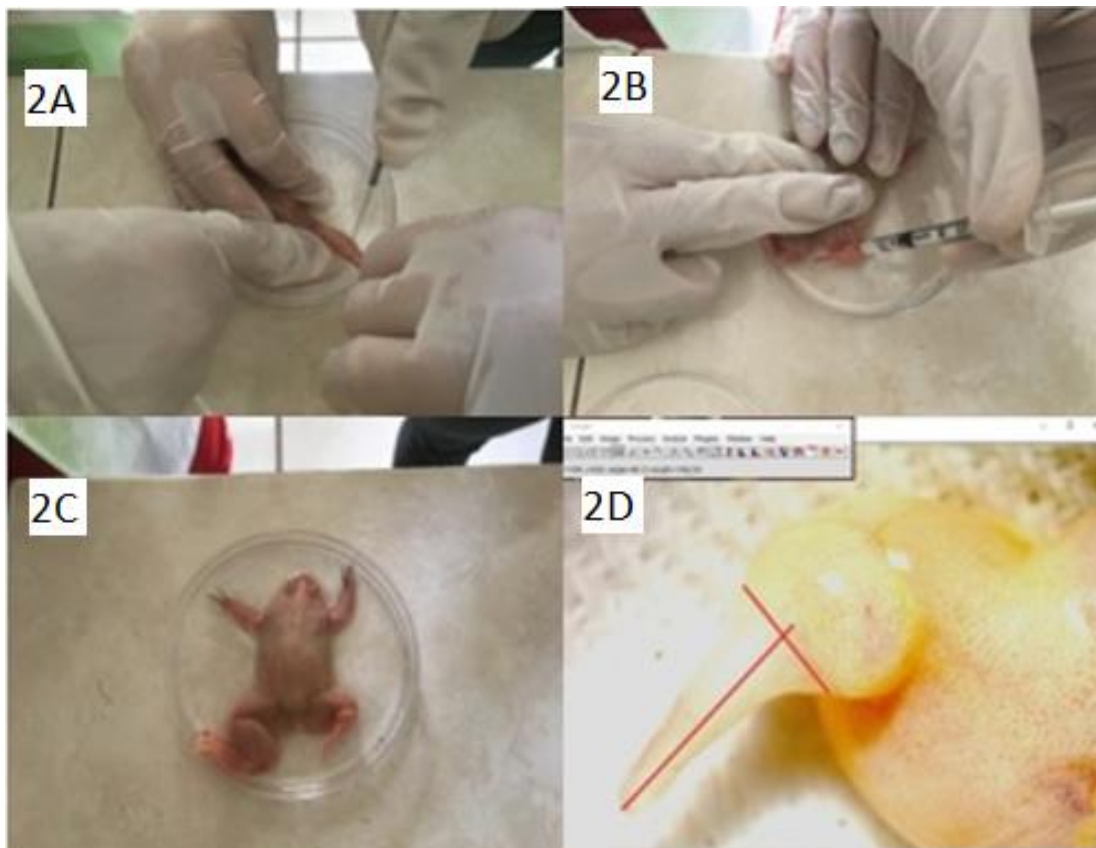


Figura 2. A) Amputación de la extremidad posterior derecha. B) Aplicación de tratamientos por inyección. C) Espícula visible D) Morfometría de la espícula

RESULTADOS

Se examinaron los efectos que tienen los aminoácidos, el suero fetal bovino, la solución fisiológica y la estimulación mecánica en la regeneración normal de *X. laevis*, estadio 66. Después de la amputación, los individuos tardaron aproximadamente de tres a cuatro horas en recubrir la herida de tejido epitelial, la cicatrización de la herida se dio adecuadamente. En segunda instancia se observó un comportamiento adaptativo a la carencia de la extremidad, ya que la funcionalidad normal del organismo fue limitada en algunos aspectos. Una vez que se comenzó con los tratamientos de aminoácidos y suero fetal bovino, los organismos respondieron adecuadamente y no mostraron ningún efecto negativo. Después de los primeros dos a tres días de inyección de aminoácidos se observó que los individuos de este grupo presentaron una cicatrización más rápida que los otros grupos, consiguiendo en menor tiempo la cicatrización total. En el cuarto día los individuos de cada grupo comenzaron a formar su blastema adecuadamente. Adicionalmente se observó que con el paso de los días el blastema se diferenciaba cada vez más. Al comienzo de la tercera semana se observó que era evidente que el crecimiento de la espícula era mucho más rápido en el tratamiento de AA, seguido del SF. Posteriormente en la sexta semana los tratamientos restantes empezaron a igualar el crecimiento de la espícula presente en los tratamientos con AA y SF.

El primer factor que se evaluó fue la longitud y ancho de cada espícula en el organismo. Como se mencionó anteriormente, se observó que las espículas presentadas en los organismos del tratamiento de AA tuvieron un crecimiento más rápido en su longitud, y en el caso de SF un crecimiento mayor en el ancho de la espícula dentro de las primeras semanas, aunque tiempo después los demás tratamientos igualaron su crecimiento con el grupo AA (Figura 3).

Una vez teniendo los datos morfométricos se aplicó una prueba estadística, lo que arrojó que no existe diferencia significativa en los tratamientos en cuanto a la longitud de la espícula ($t= 2,19$, g.l.= 4, $p=0,699$). En el caso del ancho de la espícula, la prueba estadística arrojó que no existe diferencia significativa en los tratamientos ($t=2,55$, g.l.= 4, $p=0,634$).

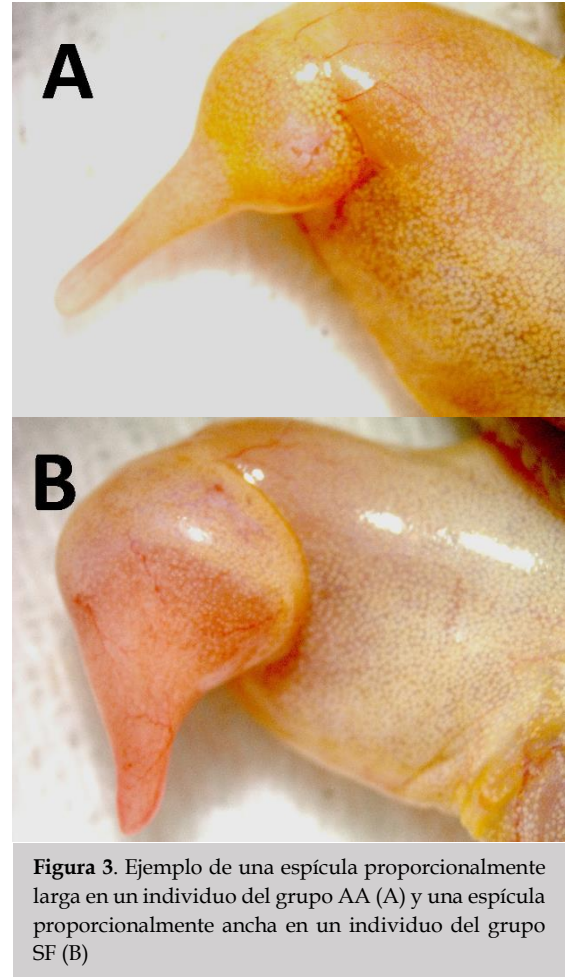


Figura 3. Ejemplo de una espícula proporcionalmente larga en un individuo del grupo AA (A) y una espícula proporcionalmente ancha en un individuo del grupo SF (B)

En segunda instancia se realizó un análisis del coeficiente de correlación de Pearson, lo que arrojó que la correlación entre lo largo de la espícula y el ancho de la misma es negativa baja ($r=0,176$), con una significancia de $p=0,399$ (Tabla 1, Figuras 4 y 5).

Por otro lado, los Coeficientes de correlación no paramétricos de Spearman y Kendall muestran valores de 0,170 y 0,127 respectivamente, (ambas negativas bajas) en cuanto a la longitud y anchura de la espícula, con significancias de $p=0,417$ y $p=0,375$, respectivamente (Tabla 2).

| Correlaciones | | Largo | Ancho |
|---------------|------------------------|-------|-------|
| Largo | Correlación de Pearson | 1 | .176 |
| | Sig. (bilateral) | | .399 |
| | N | 25 | 25 |
| Ancho | Correlación de Pearson | .176 | 1 |
| | Sig. (bilateral) | .399 | |
| | N | 25 | 25 |

Tabla 1. Datos estadísticos del coeficiente de correlación de Pearson entre la longitud y ancho de la espícula.

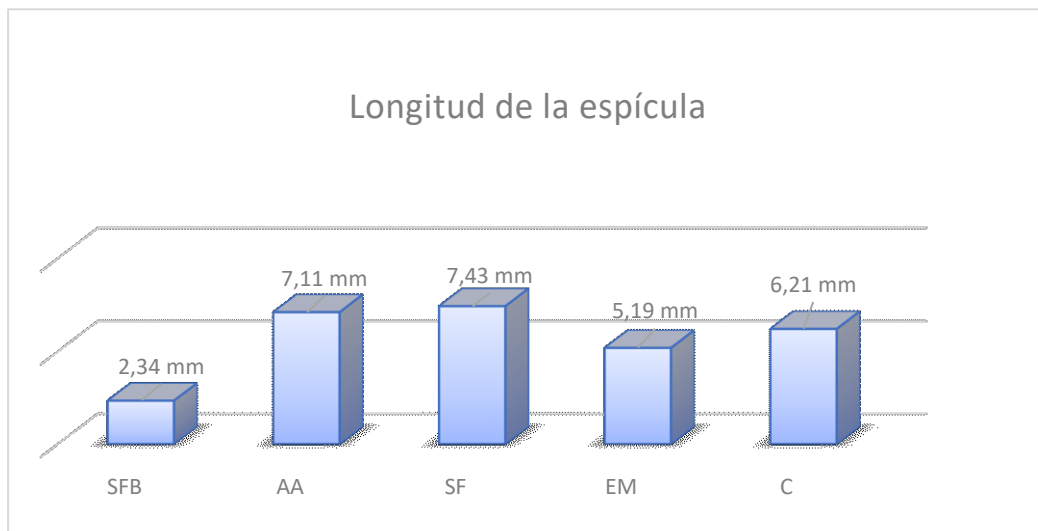


Figura 4. Longitud de la espícula en cada tratamiento.

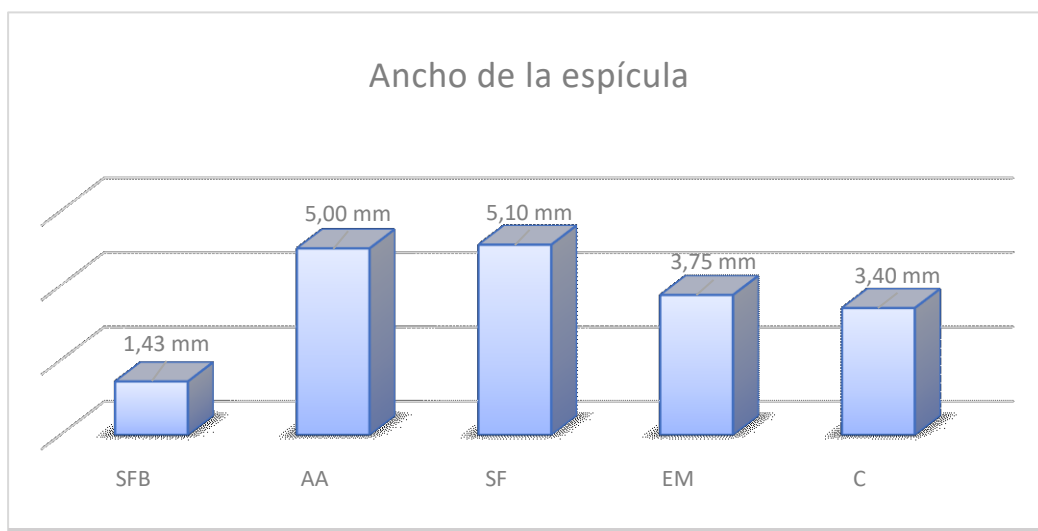


Figura 5. Ancho de la espícula en cada tratamiento.

| Correlaciones | | | Largo | Ancho |
|------------------|-------|-----------------------------|-------|-------|
| Tau_b de Kendall | Largo | Coefficiente de correlación | 1.000 | .127 |
| | | Sig. (bilateral) | . | .375 |
| | | N | 25 | 25 |
| | Ancho | Coefficiente de correlación | .127 | 1.000 |
| | | Sig. (bilateral) | .375 | . |
| | | N | 25 | 25 |
| Rho de Spearman | Largo | Coefficiente de correlación | 1.000 | .170 |
| | | Sig. (bilateral) | . | .417 |
| | | N | 25 | 25 |
| | Ancho | Coefficiente de correlación | .170 | 1.000 |
| | | Sig. (bilateral) | .417 | . |
| | | N | 25 | 25 |

Tabla 2. Datos estadísticos de Coeficientes de correlación no paramétricos de Spearman y Kendall entre el largo y ancho de la espícula.

Otro factor importante evaluado en este trabajo fue la mortalidad de los individuos en cada uno de los tratamientos. La primera fase del análisis de mortalidad fue días después de la amputación donde evaluamos la capacidad que presentaban los organismos para adaptarse al trauma sometido, en donde observamos que la mayoría de los individuos tiene una buena adaptación a este tipo de situaciones, por lo cual solo se encontraron dos individuos muertos en el periodo de cicatrización de la herida correspondiente a 3 días. Posteriormente, en la segunda fase del análisis de mortalidad, la cual se evaluó durante un periodo de 78 días, al mismo tiempo que se realizaban los tratamientos mencionados anteriormente, se observó cómo existió un declive en el número de especímenes en algunos tratamientos.

El tratamiento con un mayor número de muertes fue SFB y en el que no se registró ninguna muerte fue el grupo AA (Tabla 3).

| Tratamientos | SFB | AA | SF | EM | C |
|-----------------|-----|----|----|------|------|
| % de mortalidad | 75 | 0 | 25 | 37.5 | 37.5 |

Tabla 3. Mortalidad de cada tratamiento en porcentajes.

DISCUSIÓN

Se evaluó la capacidad de regeneración de extremidades de *Xenopus laevis* a tratamientos de

aminoácidos y suero fetal bovino. Se seleccionaron los anuros en lugar de urodelos, por las capacidades de regeneración que presentan. En el caso de los urodelos, existen organismos que presentan una regeneración completa en su etapa juvenil y adulta, mientras que algunos anuros presentan una capacidad de regeneración completa en etapas juveniles e incompletas en estado adulto (1,2,3). Esta característica presente en anuros es importante para este trabajo, porque al estar limitada la regeneración dependiendo directamente de la etapa de desarrollo, se logra observar que tanta influencia tienen los aminoácidos y suero fetal bovino en la regeneración, en etapas donde la capacidad de regeneración disminuye considerablemente.

Xenopus laevis fue seleccionada ya que después del estadio 53 y 54, su capacidad regenerativa disminuye (20), y en el presente trabajo se evaluó en el estadio 66, un estadio posterior a los mencionados anteriormente, por lo que la capacidad de regeneración es aún menor y permitiría observar de mejor manera la influencia de cada tratamiento.

Se seleccionó el corte en la región proximal de la tibia-peroné de la extremidad posterior, porque se sabe que las extremidades anteriores son de vital importancia para la especie *X. laevis*, ya que las utiliza para alimentarse y el amplexo, sin mencionar que también les ayuda a tener una buena movilidad, al contrario de sus extremidades posteriores que son utilizadas principalmente para movimiento, por lo cual amputar su extremidad posterior intervendría de una manera menor en sus actividades. Lo mencionado anteriormente coincide con lo observado por Tassava (17), respecto a la importancia que tienen las extremidades anteriores para el individuo.

Luego del corte se observó como el tratamiento de aminoácidos logro una mejor cicatrización y una velocidad de regeneración más rápida que suero fetal bovino, solución fisiológica, estimulación mecánica y control, aunque tiempo después estos mismos tratamientos igualaron la regeneración obtenida en

aminoácidos. Aguillón-Gutiérrez (22,23) menciona que proteínas biorreguladoras aisladas de suero y hueso de mamíferos, mejoraron el proceso regenerativo en *X. laevis in vivo*, pero también *in vitro*. El corte en el presente trabajo se hizo en la región proximal de la tibia-peroné de la extremidad, porque se sabe que la habilidad de *X. laevis* de regenerar depende primordialmente del nivel de amputación, mientras más distal sea la amputación, mejor se dará el proceso de regeneración (17,7), con esto se logró observar que tanta influencia tenían los tratamientos (aminoácidos, suero fetal bovino, solución fisiológica y estimulación mecánica) en la regeneración. Debido a que el corte está en la región zeugopodio, se piensa que influyó de una manera negativa en la regeneración de la extremidad, por el nivel de amputación, ya que la región en donde se amputó contiene la articulación de la rodilla, una estructura más compleja que requiere una buena capacidad regenerativa, esto tiene cierta coincidencia con lo mencionado por Aguillón-Gutiérrez (21,22), el cual menciona que los biorreguladores funcionan mejor cuando el corte es en el área proximal del fémur, ya que cuando la amputación es en partes distales los biorreguladores no tienen un efecto importante. Sin embargo otro punto a considerar son las dosis administradas, ya que las dosis que se manejaron en este trabajo dieron algunos resultados positivos en cuanto a la regeneración en las primeras etapas de este proceso con una dosis de 0.04 ml, esto es importante mencionarlo debido a que Krasnov *et al.* (23), reportan que los biorreguladores obtenidos del suero sanguíneo de mamíferos fueron más efectivos al aplicarlos en dosis bajas, mientras que los biorreguladores extraídos de hueso de mamífero resultaron con mejor efecto en la regeneración al utilizarlos en dosis muy pequeñas. Por esta razón se piensa que, al utilizar diferentes dosis de nuestro tratamiento de aminoácidos, se podría aumentar la capacidad o eficacia del proceso regenerativo en *X. laevis* por lo que se planea realizar estudios referentes a este tema.

Cabe destacar que se obtuvo la regeneración de una espícula en todos los organismos a pesar de que la amputación fue en la región zeugopodio de la extremidad, y se sabe que esto disminuye considerablemente la capacidad de regeneración (1,2,3).

La utilización del producto con aminoácidos se basó en el hecho de que aporta aminoácidos esenciales y no esenciales, las cuales ayudan en variedad de funciones en el individuo, algunos ejemplos interesantes son la regeneración de musculo, hueso y nervios. Por otro lado, también contiene vitamina A (165,00 UI) y el ácido retinoico es un metabolito de esta vitamina, esto coincide con la investigación de Tanaka y Gann (1995) (11), que utilizaron perlas empapadas de ácido retinoico para promover el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), con lo que obtuvieron que FGF es importante en la iniciación de brotes en las extremidades. Gilbert (12), menciona que el ácido retinoico juega un papel importante en la desdiferenciación de células para formar el blastema de regeneración y en los procesos de re-especificación. El segundo tratamiento fue SFB debido a que este contiene una cantidad considerable de proteínas y vitamina A, y como se mencionó anteriormente las proteínas y el ácido retinoico (metabolito de la vitamina A) ayudan a la regeneración (11,12,24). Otro factor es que el SFB es un medio ideal para el crecimiento de células *in vitro* (24,25,26), por esta razón se esperaba observar si la reproducción de células se podía duplicar *in vivo* con la aplicación de este producto. Se ha comprobado que los biorreguladores extraídos a partir de tejido ocular bovino participan activamente favoreciendo la regeneración de tejidos oculares en anfibios (26), además se seleccionó suero fetal bovino, ya que a diferencia del suero de adulto, el suero fetal bovino contiene mayores concentraciones de factores de crecimiento (24). Otro producto seleccionado fue la solución fisiológica como un control, debido a que se quería evaluar si el organismo regeneraba por la influencia de los componentes de los productos (SFB, AA) y no por estimulación de una sustancia extraña al

interior, aunque cabe destacar que se observó que el paso de esta sustancia al individuo estimuló la regeneración en cuanto al ancho de la espícula en las primeras semanas, por esta razón sería importante continuar la investigación con el uso de solución fisiológica (cloruro de sodio - NaCl, 0.9 g). En el caso de la estimulación mecánica (EM), esta se utilizó debido a que se conoce que ayuda en la regeneración en algunos organismos biológicos (28,29,30,31) por ejemplo Cezar *et al.* (29) mencionan que la estimulación directa del tejido muscular incrementa el transporte de oxígeno, nutrientes, fluidos y la eliminación de desechos desde el sitio de la lesión, que son todos los componentes vitales de la salud y la reparación del músculo, de esta forma se lograría observar que realmente la regeneración fue estimulada por los componentes de nuestros productos (AA, SFB) y no por la estimulación mecánica (pinchazo) a que fue sometido cada individuo al inyectar los tratamientos.

A pesar de que dentro de las primeras semanas AA tuvo un buen desempeño en cuanto al crecimiento de la espícula respecto a su longitud y SF en cuanto a su ancho, los análisis estadísticos arrojaron que no existe diferencia significativa en cuanto a la longitud y el ancho de la espícula en cada uno de los tratamientos.

Por otro lado en los análisis de mortalidad se obtuvo que el tratamiento con un mayor número de muertes fue suero fetal bovino (75%), esto se atribuye a que el sistema inmune del organismo actuó ante la posible amenaza de los componentes del producto creando reacciones negativas en el blastema, esto se apoya con lo mencionado por Mescher *et al.* (31), que la inmunidad cutánea es la principal barrera contra la mayoría de los patógenos ambientales e incluye células importantes para la reparación de lesiones físicas. Además, el tratamiento con aminoácidos no presentó mortalidad después de hacer la amputación, este dato es particularmente interesante, debido a que ayudo en la regeneración en las primeras semanas y a una mejor cicatrización, con lo que pensamos que los aminoácidos

pueden ayudar a los organismos en el proceso regenerativo y ante un estrés (amputación), lo que crea nuevas áreas de estudio.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se evaluó la influencia que tiene el suero fetal bovino, los aminoácidos, la solución fisiológica y la estimulación mecánica en la regeneración de extremidades posteriores en *X. laevis*, con lo que se obtuvo que no existe una diferencia significativa en los tratamientos en cuanto a la longitud de la espícula ($t=2,19$, g.l.= 4, $p=0,699$). En el caso del ancho de la espícula, la prueba estadística arrojó que no existe diferencia significativa en cada uno de los tratamientos ($t=2,55$, g.l.= 4, $p=0,634$). Probablemente fue más importante el sitio de corte (región zeugopodio) que la influencia de los tratamientos, aunque cabe destacar que en las primeras semanas de nuestro tratamiento con aminoácidos el efecto fue positivo permitiendo una mejor cicatrización y mejor regeneración de la espícula. Por otro lado el tratamiento con solución fisiológica arrojó resultados inesperados respecto a la regeneración del ancho de la espícula, dentro de las primeras semanas, por esta razón sería importante continuar la investigación con el uso de la solución fisiológica (cloruro de sodio - NaCl) y aminoácidos en diferentes etapas de desarrollo, ya que al cortar la extremidad en el estadio 66 se obtuvieron resultados positivos en la primeras semanas, por lo que se piensa que en etapas de desarrollo más tempranas los aminoácidos y la solución fisiológica podrían estimular la regeneración de extremidades. Finalmente, en los análisis de mortalidad se obtuvo que los aminoácidos tuvieron un declive del 0%, con lo que pensamos que los aminoácidos pueden ayudar a los organismos en el proceso regenerativo y ante un estrés (amputación), al contrario de suero fetal bovino el cual obtuvo un alto índice de muertes (75%), esto se atribuye a que el sistema inmune del organismo actuó ante la posible amenaza de los componentes del producto creando reacciones negativas en el blastema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morgan TH (1901) *Regeneration*. The Macmillan Company; Londres, Inglaterra.
2. Balinsky BI (1978) *Introducción a la embriología*. Omega, Barcelona, España.
3. Durá RMF (1988) *Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción*. UNAM, Ciudad de México, México.
4. Durán I (2009) Modelos de Regeneración. *Encuent Biol* 2(122):1-2.
5. Goode RP (1967) The regeneration of limbs in adult anurans. *Embryol Experimental Morphol* 18(2):259-67.
6. Bryant SV, Endo T, Gardiner DM (2002) Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. *Int J Dev Biol* 46:887-896.
7. Mescher AL, Neff AW (2006) Limb Regeneration in Amphibians: Immunological Considerations. *Sci World J* 6(S1):1-11.
8. Brockes JP (1997) Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. *Science* 276:81-87.
9. Yokoyama H., Ide H., Tamura K (2001) FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *X. laevis*. *Dev Biol* 233:72-79.
10. Mullen LM, Bryant SV, Torok MA, Blumber B, Gardiner DM (1996) Nerve dependency of Regeneration: The role of Distal-Less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Dev* 122:3487-3497.
11. Tanaka EM, Gann AFA (1995) The budding role of FGF. *Current Biol* 5(6):594-597.
12. Gilbert SF (2000) *Developmental Biology*. 6 ed. Sinauer, Massachusetts, Estados Unidos
13. Kiffmeyer WR, Tomusk EV, Mescher AL (1991) Axonal transport and release of transferrin in nerves of regenerating amphibian limbs. *Dev Biol* 147:39-402.
14. Mescher AL, Connell E, Hsu C, Patel C, Overton B (1997) Transferrin is necessary and sufficient for the neural effect on growth in amphibian limb regeneration blastemas. *Dev* 39:677-684.
15. Xenbase (2015) Introduction to *Xenopus*, the frog model. <http://www.xenbase.org/anatomy/intro.do> [consulta: 2018].
16. Nieuwkoop PD, Faber J (1956) Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North-Holland, Amsterdam.
17. Tassava RA (2004) Forelimb spike regeneration in *Xenopus laevis*: Testing for adaptiveness. *J Exp Zool* 301A:150-159.
18. Detlaf TA, Rudneva TB (1975) Rana africana de uñas *Xenopus laevis* Daudin. En: Modelos en biología del desarrollo, Astaurov BI (Ed) Nauka. (En ruso).
19. Carpenter JW (2006) *Formulario de animales exóticos*. 3ª edición. Intermédica, Buenos Aires, Argentina.
20. Dent JN (1962) Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of South African clawed toad. *J Morphol* 110:61-77.
21. Aguillón-Gutiérrez DR (2011) Influencia de las proteínas reguladoras en la regeneración de extremidades de anfibios. LAP. (En ruso).
22. Aguillón-Gutiérrez DR (2015) Investigación sobre la influencia de bioreguladores endógenos aislados de suero sanguíneo y huesos de mamíferos, en la regeneración de extremidades de anfibios. *Zhiv Biokos Sist (Sistemas Vivos y Bioinertes)* 11. (En ruso).
23. Krasnov MS, Ribakova EY, Aguillón-Gutiérrez DR, Burlakova OV, Yamskova VP, Yamskov IA (2009) Study action of bioregulators from mammal serum and bone on limb amphibian regeneration *in vivo* and *in vitro*. International Congress "Low and superlow fields and radiations in biology and medicine". Saint-Petersburg, Russia.
24. Brunner D, Frank J, Appl H, Schoff H, Pfaller W, Gstraunthaler G (2010) Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. *Altex* 27:53-62
25. Castaño ME (2012) *Cultivos celulares*. Editorial Biogenesis, Medellín, Colombia.
26. Krasnov MS (2003) Proteínas adhesivas de las células superficiales de la retina ocular de vertebrados: propiedades y efectos biológicos. Tesis de doctorado. Instituto de Biología del Desarrollo. Academia Rusa de Ciencias. (En ruso).
27. Muller TL, Mullert VN, Reginelli A, Taylor G, Anderson R, Muneoka K (1999) Regeneration in higher vertebrates: Limb buds and digit tips. *Sem Cell Dev Biol*, 10:405-413.
28. Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA (1998) Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Rel Res* 355:S41-S55.
29. Cezar CA, Roche ET, Vandeburgh HH, Duda GN, Walsh CJ, Mooney DJ (2016) Biologic-free mechanically induced muscle regeneration. *PNAS* 113:1534-1539.
30. Hadlock T, Lindsay R, Edwards C, Smitson C, Weinberg J, Knox C, Heaton JT (2010) The effect of electrical and mechanical stimulation on the regenerating rodent facial nerve. *Laryng* 6:1094-102.
31. Mescher AL, Wolf WL, Moseman EA, Hartaman B, Harrison C, Nguyen E, Neff AW (2007) Cells of cutaneous immunity in *Xenopus*: Studies during larval development and limb regeneration. *Dev Comp Immunol* 31:383-393.
32. Zar JH (2009) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall International, 5ta edición, Londres, Inglaterra.

Recibido enero 1, 2020 - Aceptado agosto 4, 2020

* Correspondencia de autor: David Ramiro Aguillón-Gutiérrez. Laboratorio de Bioindicadores, Centro de Investigación y Jardín Etnobiológico, Universidad Autónoma de Coahuila. Dr. Francisco González 37, Viesca, Coahuila, México. C.P. 27480. E-mail: david_aguillon@uadec.edu.mx