



**AUMENTO DE PROLIFERACIÓN Y NEUROGÉNESIS EN LA  
MÉDULA ESPINAL DE *XENOPUS LAEVIS* EN RESPUESTA A LA  
SOBRE EXPRESIÓN DE LIN28**

**Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular  
y Molecular**

**Por**

**MAURICIO ALEJANDRO HERRERA ROJAS**

**Director de Tesis: Dr. Juan Larraín**

**Co-Director de Tesis: Dra. Rosana Muñoz Videla**

**Enero, 2022**



**AUMENTO DE PROLIFERACIÓN Y NEUROGÉNESIS EN LA  
MÉDULA ESPINAL DE *XENOPUS LAEVIS* EN RESPUESTA A LA  
SOBRE EXPRESIÓN DE LIN28**

**Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular  
y Molecular**

**Por**

**MAURICIO ALEJANDRO HERRERA ROJAS**

**Director de Tesis: Dr. Juan Larraín**

**Co-Director de Tesis: Dra. Rosana Muñoz Videla**

**Comisión de Tesis: Dr. Julio Amigo  
Dra. Alejandra Álvarez  
Dr. Álvaro Glavic  
Dr. Hugo Olguin**

**Enero, 2022**

## DEDICATORIA

*Dedicado*

*A mi hermosa hija Isidora, mi negrita, mi chanchita, por tu infinito amor y por hacer de mí una mejor persona.*

*A Katherine, por tu amor incondicional incluso en los momentos más difíciles.*

*A mis padres Catalina y Luis por sus consejos, apoyo y comprensión.*

*A Rosana porque nunca perdiste la fe en mí*

## AGRADECIMIENTO

A Juan, por darme la oportunidad de ser parte de su tremendo laboratorio. Por todo el apoyo económico en compras de insumos y complemento de beca que fueron fundamentales en esta etapa.

Un agradecimiento grande a todos mis compañeros de laboratorio, los actuales y los que emprendieron un nuevo rumbo. Gracias a Fernando, Daniel G, Karina, Paula, Cony, Katy, Dasfne, Emilio, Sol, Javier, Marce, Sergio, Pablo, Anto, Paty y Daniel V, que día a día contribuyeron a tener un excelente ambiente laboral, por las extensas charlas hablando de ciencias y otros temas. A cada uno de ustedes que aportó tanto en mi formación científica como en la formación personal.

A la Ángela, Gleni y Max N por su dedicación en el cuidado y mantención de los animales, porque su trabajo es fundamental para el nuestro. Por la amistad, consejos y las charlas en el bioterio. Por la paciencia de cuidar a mis animales cuando yo fallaba.

Un especial agradecimiento a un gran amigo de laboratorio, un compañero de viajes y congresos, muchas gracias Johany por toda tu ayuda y apañe durante todos estos años.

A la Clau, por el apoyo en los momentos difíciles, por millones de consejos y por la insistencia de siempre estar presente y presionándome para continuar dando todo en ciencias.

A Don Héctor C y Max L por sus funciones de lab manager, porque siempre se preocuparon de tener todo lo que necesitábamos para trabajar. Por la confianza y ayuda en los experimentos. Por todas sus gestiones y por la amistad.

A mis grandes amigos del doctorado, Fabi y Dux. Por toda su colaboración, por su amistad, por aguantar mi carácter y por siempre haber estado ahí cuando los necesité. Destaco a mi Good Friend Fabi, por apañarme cuando decidimos ser representantes de BCM por dos 2 años. Porque siempre apoyó mi gestión y colaboró en lo que se necesitó.

A la Dra. Estela Andrés, porque siempre tuvo las puertas abiertas de su laboratorio para cuando necesité de su ayuda y utilizar sus equipos. Gracias por la confianza y por ser la primera que me enseñó de ciencias. Gracias también a todo su laboratorio y la buena onda siempre.

A mi Javibti, por estar conmigo hasta el último día de la entregar, alentándome como la mejor cheerleader que alguien puede tener.

Por sobre todo agradezco a una compañera que se convirtió en amiga, una amiga que se convirtió en co-tutora, una co-tutora que se convirtió en un ejemplo a seguir, un ejemplo de vida y esfuerzo. Te agradezco Rosana por cada momento que dedicaste en ayudarme a salir adelante, porque gracias a ti, hoy estoy ad-ortas de concluir una etapa. Porque cuando perdí el interés, fuiste tú la que me levantó y camino junto mí para guiarme en este camino que se volvió oscuro. No hay palabras que resuman la suerte que tuve de que nuestros caminos se cruzaran.

Muchas gracias a toda la Dirección de postgrado por todas las gestiones, certificados en tiempo record, coordinación, ayuda cuando fui representante y la amabilidad que siempre tuvieron al asistirnos. Muchas gracias a María Teresa, Elizabeth, Mauricio Lima y Diego Bustamante. Excelente equipo.

Muchas gracias a todos los que, de alguna forma, formaron parte de mi vida en este proceso.

## **FINANCIAMIENTO**

Agradezco a las siguientes fuentes de financiamiento, que me ayudaron en este proceso de

- 1- Beca Colegio de Programas Doctorales VRI-CPD 2015 – 2017.
- 2- Beca CONICYT de Apoyo para Asistencia a Congresos Nacionales.
- 3- Beca CONICYT de Doctorado Nacional 2018.
- 4- Beca CONICYT de Gastos Operacionales.
- 5- Center for Aging and Regeneration (CARE) PFB 12/2007.
- 6- Núcleo Milenio en Biología Regenerativa (MINREB) RC120003.
- 7- Apoyo para asistencia a Congresos de la Vicerrectoría adjunta de Investigación y Doctorado de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 8- Apoyo para asistencia a Congresos de la Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia.
- 9- EMBO travel grant for conference 2018.
- 10- Full Scholarship support at Comparative Regeneration Biology Course 2017.

## ÍNDICE DE MATERIA

<b>DEDICATORIA</b> .....	1
AGRADECIMIENTO .....	2
FINANCIAMIENTO.....	4
ÍNDICE DE MATERIA .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN .....	14
ABSTRACT.....	17
INTRODUCCIÓN.....	20
<b>1. Daño a la Médula Espinal</b> .....	20
<b>2. Modelos mamíferos para estudiar daño a la médula espinal</b> .....	22
<b>3. Modelos no-mamíferos para estudiar el daño a la médula espinal</b> .....	22
<b>4. <i>Xenopus laevis</i> y regeneración</b> .....	24
<b>5. Células troncales neurales y progenitores neurales</b> .....	25
<b>6. Neurogénesis en Respuesta a Daño</b> .....	27
<b>7. Lin28, un gen heterocrónico</b> .....	29

8. Efecto de la ausencia y sobre expresión de Lin28 .....	32
HIPÓTESIS .....	36
OBJETIVO GENERAL.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
MATERIALES .....	37
1. Animales y su mantención.....	37
1.1. <i>Xenopus laevis</i> silvestres.....	37
1.2. <i>Xenopus laevis</i> transgénicos para Lin28a .....	37
1.3. Alimento para animales <i>Xenopus laevis</i> .....	38
1.4. Sala de mantención de animales.....	38
1.5. Cirugía de la médula espinal .....	38
2. Biología Molecular y Celular .....	39
2.1. Extracción de muestras .....	39
2.2. RT-qPCR.....	39
2.3. Western blot .....	40
2.4. Fijación y deshidratación de médulas.....	42
2.5. Inmunofluorescencia en criosecciones .....	42
2.6. Análogo de timidina .....	43
3. Insumos generales .....	43
4. Equipos y Programas.....	44
MÉTODOS .....	46
1. <i>Xenopus laevis</i> .....	46
1.1. Fertilización natural de <i>Xenopus laevis</i> silvestre .....	46
1.2. Fertilización natural de <i>Xenopus laevis</i> Lin28a .....	47
1.3. Crecimiento y manipulación de <i>Xenopus laevis</i> .....	47
2. Cirugía de la médula espinal: Transección .....	48
2.1. Animales NF50.....	48
3. Biología Molecular .....	49
3.1. Extracción de mRNA .....	49
3.2. Síntesis de cDNA (RT-PCR).....	50

3.3.	qPCR.....	51
3.4.	Extracción de proteínas .....	51
3.5.	Electroforesis y Western blot .....	52
4.	Biología Celular.....	53
4.1.	Inmunofluorescencia .....	53
5.	Estudio de la Proliferación.....	55
5.1.	Inyección intracelómica de EdU.....	55
5.2.	Caza del pulso de EdU .....	55
5.3.	Reacción de Click-iT .....	55
6.	Microscopía y procesamiento de imágenes.....	56
7.	Estadística.....	57
8.	Bioética y Bioseguridad .....	57
	RESULTADOS .....	58
1.	Respuesta de las células Sox2+ al daño a la médula espinal en estadios regenerativos.....	58
1.1.	Proliferación de las células Sox2+ de la médula espinal de <i>Xenopus laevis</i> en respuesta al daño. ....	58
1.2.	Neurogénesis en la médula espinal de <i>Xenopus laevis</i> en respuesta al daño... ..	65
2.	Caracterización de los niveles de Lin28a en animales transgénicos. ....	70
3.	Sobre expresión de Lin28a.....	74
3.1.	Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la proliferación de progenitores neurales Sox2+. ....	74
3.2.	Efecto de la sobre expresión de Lin28a sobre marcadores de progenitores neurales.....	82
3.3.	Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la neurogénesis .....	84
3.4.	Efecto de la sobre expresión de Lin28a en estadios no regenerativos de <i>Xenopus laevis</i> . ....	92
	DISCUSIÓN .....	98
1.	Proliferación Celular y Progenitores de la Médula Espinal de <i>Xenopus laevis</i> .....	99
2.	Neurogénesis en Respuesta al Daño en <i>Xenopus laevis</i> .....	102
3.	Lin28: Proteína de Unión a RNA .....	105
3.1.	Efecto de Lin28 en la Proliferación Celular.....	105

<b>3.2. Efecto de Lin28 en la Neurogénesis .....</b>	<b>108</b>
<b>3.3. Efecto de Lin28 en animales no regenerativos.....</b>	<b>109</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>115</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Daño a la médula espinal y efecto sobre la motricidad.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 2: Esquema de la progresión de la neurogénesis.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 3: Regulación Lin28/Let7.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 4: Aumento de la proliferación de progenitores en respuesta al daño.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 5: Aumento de la proliferación celular en la médula espinal en respuesta al daño .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 6: Aumento de la proliferación de progenitores neurales en respuesta al daño... </b>	<b>64</b>
<b>Figura 7: Neurogénesis en la médula espinal en respuesta al daño.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 8: Aumento de la neurogénesis en la médula espinal en respuesta al daño.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 9: Animales transgénicos para Lin28a.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 10: Caracterización de animales transgénicos F1 para Lin28a.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 11: Lin28a se mantiene estable hasta los 10 días posteriores a la sobre expresión en animales transgénicos.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 12: Sobre expresión de Lin28a produce aumento de la proliferación celular en la médula espinal de animales transgénicos Lin28a.....</b>	<b>76</b>

<b>Figura 13: Aumento de la proliferación celular en respuesta a la sobre expresión de Lin28a en la médula espinal de animales Lin28a.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 14: Aumento de la proliferación de progenitores neurales en respuesta a la sobre expresión de Lin28a en la médula espinal de animales transgénicos.....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 15: Proliferación de progenitores neurales Sox2 del total de células en proliferación en respuesta a la sobre expresión de Lin28a en la médula espinal de animales transgénicos.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 16: Aumento de Nestin en respuesta a la sobre expresión de Lin28a.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 17: Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la neurogénesis de la médula espinal.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 18: Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la neurogénesis.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 19: Sobre expresión de Lin28a produce aumento de genes marcadores de neuroblastos a tiempos tardíos.....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 20: Efecto de la sobre expresión de Lin28a sobre los niveles del mensajero y la proteína Sox2 a tiempo tempranos en animales no regenerativos.....</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I: Secuencia de partidores utilizados.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla II: Anticuerpos para western blot.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla III: Anticuerpos para inmunofluorescencia.....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Ascl1	Achaete-scute homolog 1
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
cc	Canal central
DCX	Doblecortina
DME	Daño a la médula espinal
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
Dox	Doxiciclina
dpHS	Días post shock térmico
dps	Días post sham (operación control)
dpt	Días post transección
DTT	Dithiothreitol
EdU	5-etinil-2'-deoxyuridina
H&E	Tinción de Hematoxinina y eosina
H <sub>2</sub> O	Agua libre de cloro
hCG	Hormona gonadotrofina coriónica humana
HS	Shock térmico
IGF2	Factor de crecimiento insulínico 2
Let 7	Micro RNA Let 7
Lin28	Proteína de unión a RNA Lin28
Lin28a	Parálogo A de Lin28
Lin28b	Parálogo b de Lin28

mg	Miligramos
miRNA	Micro RNA
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
NB	Neuroblasto
NF	Estadio del desarrollo de <i>Xenopus laevis</i> en Niewkoop & Faber
nm	Nanómetro
NPC	Célula progenitora neural
NRG2	Neurogenina 2
NRG3	Neurogenina 3
NSC	Célula madre neural
OCT	Optimal Cutting Temperature compound
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	PBS con Tritón X-100
PFA	Parafolmaldehído
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SGZ	Zona subgranular
SNC	Sistema Nervioso Central
Sox2	Sex determining Region Y-box 2
SVZ	Zona subventricular
U	Unidades
WB	Western blot
WT	Animal silvestre
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar

## RESUMEN

En humanos un daño a la médula espinal se considera irreversible, sin embargo, existen animales con alta capacidad regenerativa tales como el pez cebra, el ajolote y la rana *Xenopus laevis* los cuales son capaces de regenerar la médula espinal después de un daño, recuperando las conexiones y movilidad perdida producto de la lesión. Para el estudio de la regeneración de la médula espinal, *Xenopus laevis* presenta ventajas que lo hacen un modelo único de estudio. En etapas pre-metamórficas es un animal con la capacidad de regenerar la médula, mientras que durante y después de la metamorfosis, este animal pierde esas capacidades, por lo que se transforma en un animal no regenerativo.

Estudios de nuestro laboratorio utilizando a *Xenopus laevis* sugieren que, para que ocurra regeneración de la médula espinal en estadios regenerativos, es necesario la activación de progenitores neurales identificados como células Sox2+. Al analizar los niveles de expresión de Sox2, se ha visto que estos disminuyen a medida que la rana avanza el desarrollo

(metamorfosis). Por lo tanto, se determinó que la disminución de Sox2, podría ser una causa del porqué la rana pierde las capacidades regenerativas en estadios pre-metamórficos.

La pregunta que surge en cuestión es ¿existe algún factor que pueda regular a los progenitores neurales Sox2+ y promover la neurogénesis para la regeneración de la médula espinal? Cimadamore en el 2013 demostró que la sobre expresión exógena de la proteína de unión a RNA Lin28 era suficiente para rescatar a los progenitores neuronales de un defecto proliferativo en los estadios más tempranos de la neurogénesis, asociados a la pérdida de Sox2. En el mismo año, el grupo de Shyh-Chang demostró que se mejoraba la regeneración acelerando el recrecimiento de cartílagos, huesos y tejido mesenquimal después de la amputación de los dígitos distales o la perforación de las orejas en los animales. Por último, una expresión constitutiva de Lin28 en células P19, causó un bloqueo completo de glicogénesis acompañado de un incremento en la neurogénesis. Estos antecedentes nos hacen pensar Lin28 podría ser un factor preponderante para inducir la regeneración en la médula espinal mediante la regulación de los progenitores neurales Sox2+.

En base a esto, nosotros presentamos la siguiente hipótesis: La sobre expresión de Lin28 produce un aumento de proliferación celular y de la neurogénesis en la médula espinal de *Xenopus laevis*

Nuestros resultados muestran que hay un aumento significativo de la proliferación de progenitores Sox2 en la médula espinal de la rana producto del daño y que a través de los métodos clásicos de estudio de la neurogénesis con la utilización de un marcador de neurona madura NeuN, se observó que existe neurogénesis en respuesta al daño en estadios regenerativos

de *Xenopus laevis*, por lo tanto, la neurogénesis podría ser un posible mecanismo por el cual la rana puede regenerar la médula espinal después de una daño.

Además, los ensayos de sobre expresión de Lin28a en estadios regenerativos demostraron que esta proteína de unión a RNA, regularía la proliferación celular aumentando la actividad de las células progenitoras e induciría la diferenciación celular hacia un fenotipo neuronal generando un aumento en la neurogénesis en la médula espinal en ausencia de daño. Por lo tanto, nosotros creemos Lin28a sería un buen candidato de estudio para la regeneración de la médula espinal de *Xenopus laevis* a través del aumento de la neurogénesis.

## ABSTRACT

In humans, damage to the spinal cord is considered irreversible; however, there are animals with high regenerative capacity, such as the zebrafish, the axolotl, and the frog *Xenopus laevis*, which are capable of regenerating the spinal cord after damage, recovering the connections and mobility lost as a result of the injury. For the study of spinal cord regeneration, *Xenopus laevis* has advantages that make it a unique study model. In the pre-metamorphic stages, it is an animal able to regenerate the marrow. In contrast, this animal loses these abilities during and after metamorphosis, becoming a non-regenerative animal.

Studies from our laboratory using *Xenopus laevis* suggest that, for spinal cord regeneration to occur in regenerative stages, the activation of neural progenitors identified as Sox2+ cells are necessary. When analyzing the expression levels of Sox2, it has been seen that they decrease as the frog advances in development (metamorphosis). Therefore, it was determined that the decrease in Sox2 could cause why the frog loses regenerative capacities in pre-metamorphic stages.

The question that arises in question is there any factor that can regulate Sox2+ neural progenitors and promote neurogenesis for spinal cord regeneration? Cimadamore 2013 demonstrated that the exogenous overexpression of the RNA-binding protein Lin28 was sufficient to rescue neuronal progenitors from a proliferative defect in the earliest stages of neurogenesis associated with the loss of Sox2. In the same year, Shyh-Chang's group demonstrated that regeneration was enhanced by accelerating the regrowth of cartilage, bone, and mesenchymal tissue after distal digit amputation or ear piercing in animals. Finally, a constitutive expression of Lin28 in P19 cells caused a complete blockade of glycolysis accompanied by an increase in neurogenesis. These antecedents make us think that Lin28 could be an essential factor inducing regeneration in the spinal cord through the regulation of Sox2+ neural progenitors.

Based on this, we present the following hypothesis: The overexpression of Lin28 produces an increase in cell proliferation and neurogenesis in the spinal cord of *Xenopus laevis*.

Our results show that there is a significant increase in the proliferation of Sox2 progenitors in the spinal cord of the frog as a result of damage and that through the classic methods of studying neurogenesis with the use of a NeuN mature neuron marker, it was observed that there is neurogenesis in response to damage in regenerative stages of *Xenopus laevis*, therefore, neurogenesis could be a possible mechanism by which the frog can regenerate the spinal cord after injury.

In addition, Lin28a overexpression assays in regenerative stages showed that this RNA-binding protein would regulate cell proliferation by increasing progenitor cells' activity and

inducing cell differentiation towards a neuronal phenotype, generating an increase in neurogenesis in the bone marrow. Spinal cord in the absence of damage. Therefore, we believe Lin28a would be an excellent candidate to study *Xenopus laevis* spinal cord regeneration through increased neurogenesis.

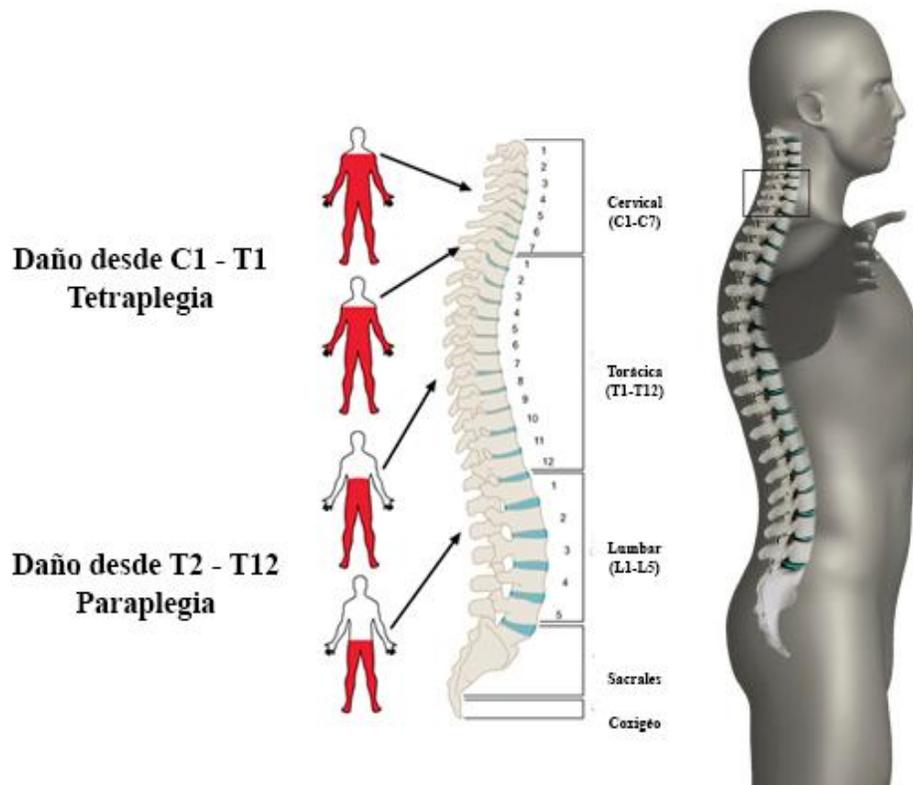
## INTRODUCCIÓN

### 1. Daño a la Médula Espinal

Se entiende, por Daño a la Médula Espinal (DME), al daño parcial o total de las conexiones nerviosas en una sección de la médula espinal que ocasiona una pérdida de neuronas, oligodendrocitos, y astrocitos e interrumpe la conexión entre el cerebro y el resto del cuerpo (Sabelström et al., 2013; Tuszynski & Steward, 2012). Dependiendo del nivel vertebral y profundidad del daño, un DME puede causar diferentes alteraciones neurológicas que incluyen disfunción sensorial, autónoma como lo son la sexual, urinaria, cardiovascular e intestinal (Hutson & Di Giovanni, 2019) y motora que puede llevar a un cuadro de paraplejia o cuadriplejia debido a la pérdida de las funciones motoras inmediatamente bajo la zona del daño (Fig. 1) (Barnabé-Heider & Frisén, 2008; S. Thuret et al., 2006).

La Organización Mundial de la Salud estima que, cada año, entre 250.000 y 500.000 personas en el mundo sufren algún tipo de daño que afecta a la integridad de la médula espinal.

Personas con una lesión en la médula espinal, tienen de 2 a 5 veces más probabilidad de morir prematuramente que aquellas personas sin lesión, con una peor tasa de sobrevivencia en países que presentan un índice de desarrollo mediano y bajo (World Health Organization, 2013).



**Figura 1: Daño a la médula espinal y efecto sobre la motricidad.** Esquema que representa el nivel de parálisis según la zona y profundidad del daño. Un DME puede ocasionar un cuadro de tetraplejia si se produce a nivel cervical (sobre T1) o de paraplejia si es bajo la vertebra T2 del segmento torácico. La región roja en las figuras humanas de la izquierda indica la zona que queda con parálisis según la localización del daño. Adaptado de (Barnabé-Heider & Frisén, 2008; Royal College of Obstetricians & Gynaecologists, 2020)

## **2. Modelos mamíferos para estudiar daño a la médula espinal**

En mamíferos, el DME es prácticamente irreversible porque el proceso regenerativo es poco efectivo, esto es debido a que la regeneración y reparación de los tejidos están restringidos a los primeros estadios del desarrollo embrionario (Ferretti et al., 2003; Godwin, 2014; Porrello et al., 2011; Willyard, 2013). En cambio, en estadios post-embrionarios, el DME origina una cicatrización glial (Tuszynski & Steward, 2012) y desmielinización axonal que impiden la correcta regeneración y recuperación funcional de la médula espinal (Totoiu & Keirstead, 2005). Si bien la formación de la cicatrización glial impide la regeneración, también es importante mencionar que este tipo de respuesta disminuye y limita el daño secundario producto de factores inflamatorios, con llevando a prevenir la necrosis y apoptosis celular más allá del sitio de la lesión (Gaudet & Fonken, 2018).

## **3. Modelos no-mamíferos para estudiar el daño a la médula espinal**

Existen vertebrados, como el pez cebra, la salamandra, la lagartija, el ajolote, la lamprea y la rana *Xenopus . laevis* (*X.laevis*), que poseen una alta capacidad regenerativa, aunque en el caso de la rana *Xenopus*, estas altas capacidades regenerativas se acotan a estadios larvarios principalmente (Echeverri, 2020; Hanslik et al., 2019; Lee-Liu et al., 2013).

Utilizando estos modelos de animales, con alta capacidad regenerativa, se han demostrado dos posibles mecanismos para la regeneración de la médula espinal después de un daño; 1) Axogénesis: que corresponde al crecimiento de axones desde los cuerpos neuronales que quedaron dañados después de la lesión o también de axones no dañados y 2) Neurogénesis: que corresponde a la formación de nuevas neuronas a partir de células progenitoras neurales

(NPC) que se encuentra en la zona adyacente al canal central de la médula espinal llamada capa ependimaria (Alunni & Bally-Cuif, 2016; Tanaka & Ferretti, 2009; G. Zhang et al., 2014).

Varias terapias están siendo estudiadas para mejorar la regeneración del sistema nervioso central (SNC), tales como la liberación de factores tróficos en el sitio del daño, inducción del crecimiento de axones, manipulación de señales intracelulares, matrices artificiales de soporte (biomateriales), modulación del sistema inmune y el trasplante celular para inducir neurogénesis (Courtine & Sofroniew, 2019; Horner & Gage, 2000; Venkatesh et al., 2019). Hasta el momento ninguna terapia ha permitido restaurar de forma completa la función motora y sensorial después del daño (Ashammakhi et al., 2019; Courtine & Sofroniew, 2019; Kwon et al., 2010) y se cree que, con la utilización de terapias combinadas, se podrían obtener mejores resultados (Ashammakhi et al., 2019; Courtine & Sofroniew, 2019; Tanaka & Ferretti, 2009).

Sin embargo, es necesario que la investigación científica básica, proporcione una base racional y experimental para la adaptación de determinadas combinaciones de terapias clínicas en los diferentes tipos de DME, como por ejemplo la utilización de biomateriales combinado con el trasplante de células o moléculas soluble para inducir crecimiento axonal (Ashammakhi et al., 2019).

Aún falta mucho por comprender la regeneración de la médula espinal, y así como el uso de mamíferos ha permitido comprender las bases moleculares de los eventos que se desarrollan después de un DME y que impedirían que la regeneración ocurra, el uso de animales con alta capacidad regenerativa como *X. laevis* en estadios larvales ha permitido ir dilucidando los mecanismos por los cuales la regeneración ocurre (Sofroniew, 2018).

#### 4. *Xenopus laevis* y regeneración

El DME en humanos suele ser a nivel cervical o torácico principalmente, por esta razón, la contusión y la transección de la médula a nivel torácico han emergido como métodos para la generación de lesiones que se asemejan más a lo que ocurre en los seres humanos (Borodinsky, 2017; Edwards-Faret et al., 2017; Lee-Liu et al., 2013; G. Lin et al., 2007; Slack et al., 2008; Tanaka & Ferretti, 2009).

Utilizando a *X. laevis* como modelo animal y a la transección de la médula espinal como método de daño, en nuestro laboratorio se estudian los procesos celulares y moleculares que ocurren luego de realizar un DME, y así, comprender los mecanismos involucrados en la regeneración de la médula espinal.

Comparando estadios regenerativos (NF50) y no regenerativos (NF66), se ha demostrado que las células progenitoras neurales (NPC) residentes en la zona endimaria que expresan el factor de transcripción Sox2+, contribuyen a la regeneración de la médula espinal después de la transección. Se observó, además, que los niveles de Sox2 disminuyen durante la metamorfosis concomitante con la pérdida de la capacidad regenerativa del animal (Edwards-Faret et al., 2018; Gaete et al., 2012; Muñoz et al., 2015). Por medio de ensayos de proliferación celular utilizando el análogo de timidina, Bromo deoxiuridina (BrdU), se demostró que existe una transiente y masiva proliferación de células NPC Sox2+ en respuesta al DME en estadios regenerativos a diferencia de lo observado en estadios no regenerativos en donde la proliferación es mucho menor o casi nula (Muñoz et al., 2015). En cambio, se evidenció un aumento de la proliferación de otros tipos celulares no identificado que podrían corresponder a células del

sistema inmune (Ej. macrófagos) (Ahuja et al., 2017; Maldonado-Lasunción et al., 2018; Milich et al., 2019), o a células del SNC no neuronales como microglía, astrocitos y precursores de oligodendrocitos (Echeverri, 2020; Gaudet & Fonken, 2018).

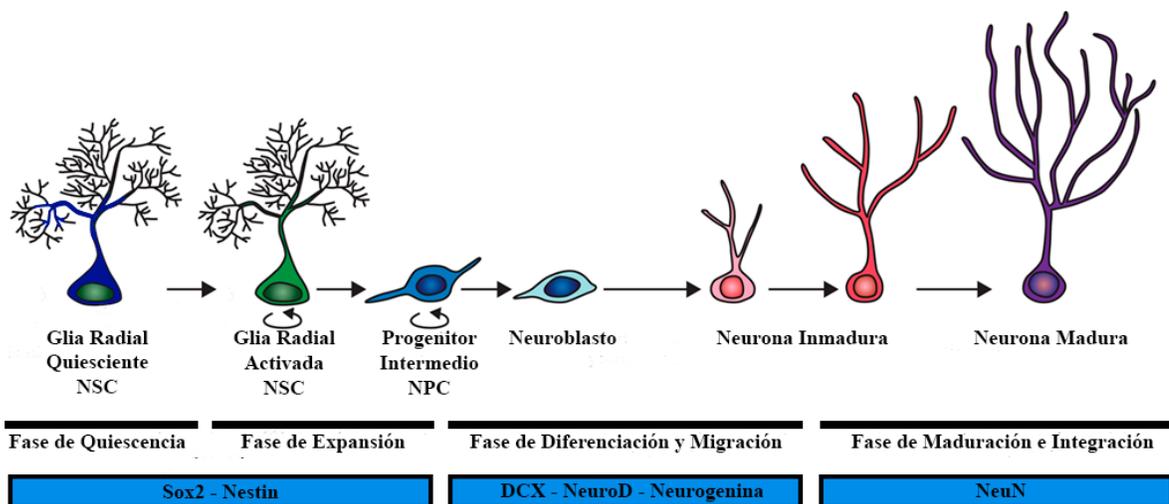
El análisis de la regulación diferencial de genes por RNA-seq, demostró que, en respuesta a un DME, aumenta la expresión de genes relacionados con neurogénesis como *sox-d*, *ascl1*, *sox21*, *neuroD4*, etc (Lee-Liu et al., 2014; Muñoz et al., 2015). Esto en conjunto, sugiere que la activación de células Sox2+ sería crucial para el proceso regenerativo hipotetizando que este tipo celular podría diferenciarse hacia un fenotipo neuronal, por lo tanto, una clave para mejorar la regeneración, podría ser la regulación de este tipo celular.

## **5. Células troncales neurales y progenitores neurales**

Basándose en sus propiedades funcionales, en el SNC se pueden diferenciar dos clases de células indiferenciadas según su potencialidad: las células troncales neurales (NSC) y los NPC (Fig. 2). Los primeros son células indiferenciadas con la capacidad para auto renovarse (Martín-Suárez et al., 2020) y diferenciarse hacia diferentes linajes. Este tipo celular puede estar en un estado de quiescencia o en un estado activado, listo para autorrenovarse o diferenciarse. Por otro lado, están los progenitores neurales o NPC. Estas células están más comprometidas con un linaje específico y poseen la capacidad de proliferar y dar origen a un solo tipo celular. A diferencia de las NSC, las NPC tienen un número limitado de ciclos de proliferación (Geuna et al., 2001; Seaberg & van der Kooy, 2003; Wurmser & Gage, 2002).

El desarrollo del SNC parte con un número pequeño de células con la capacidad de auto renovarse indefinidamente, estas células multipotentes son conocidas en el SNC como células

neuroepiteliales y están encargadas de la formación del tubo neural en estadios embrionarios y mantención del SNC en etapas posteriores (Merkle & Alvarez-Buylla, 2006). Conforme avanza el desarrollo, las NSC podrían ser reemplazadas en parte por un tipo diferente de células llamadas glías radiales las cuales estarían restringidas a los nichos neurogénicos del ventrículo (Lim & Alvarez-Buylla, 2016).



**Figura 2: Esquema de la progresión de la neurogénesis.** Las neuronas maduras pueden generarse a partir de células gliales activadas que proliferan y generan NPC los cuales se diferencian hasta neuronas o también se originan a partir del mismo NPC a través de varias rondas de amplificación. Aadaptado de (Amrein et al., 2015).

En forma importante, las células NSC y NPC se activan frente al daño (Anthony et al., 2004; Edwards-Faret et al., 2018; Gaete et al., 2012; Hartfuss et al., 2001; Malatesta et al., 2000; Muñoz et al., 2015; Noctor et al., 2002; Than-Trong & Bally-Cuif, 2015), tanto en lesiones traumáticas en el cerebro como en el DME (Deng, 2010; Edwards-Faret et al., 2018; Gaete et al., 2012; Kizil et al., 2012; G.-L. Ming & Song, 2011), incrementando la neurogénesis y la

migración celular, hacia el sitio de la lesión, como un mecanismo de repuesta para inducir regeneración (Echeverri, 2020; Kishimoto et al., 2012; Muñoz et al., 2015).

Una pregunta recurrente es ¿cuál o cuáles son los factores que regularían diferencialmente a las NSC/NPC permitiendo neurogénesis en respuesta al daño en estadios regenerativos?, o, dicho de otra manera, ¿existirá en las NSC/NPC, algún factor responsable de la capacidad regenerativa durante el desarrollo y que disminuye en etapas adultas?

## **6. Neurogénesis en Respuesta a Daño**

La neurogénesis es el proceso por el cual se generan nuevas neuronas funcionales a partir de progenitores neurales en el SNC (Fig. 2), necesario tanto para el desarrollo como para la mantención funcional del SNC en los animales (Gheusi et al., 2013; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; R. Lin & Iacovitti, 2015; G.-L. Ming & Song, 2011; Tai et al., 2020).

En condiciones fisiológicas, la neurogénesis ocurre a lo largo de toda la vida y no sólo durante la embriogénesis como se creía en un principio (Alunni & Bally-Cuif, 2016; G.-L. Ming & Song, 2011; G. Ming & Song, 2005). Sin embargo, en etapas postnatales y adultas la neurogénesis ocurre a menores tasas quedando restringida a zonas específicas del SNC denominadas nichos neurogénicos (Alunni & Bally-Cuif, 2016; Bergmann et al., 2015; Y. Li & Guo, 2020; Lindsey & Tropepe, 2006). En forma importante ha sido posible observar neurogénesis en respuesta al daño en el SNC y esto resulta muy interesante de estudiar, ya que, en mamíferos los mecanismos regenerativos no son suficientes para responder a daños patológicos y regresar al sistema a un estado homeostático adecuado a diferencia de los ocurrido

en animales con altas capacidades regenerativas (Benraiss et al., 1999; Y Guo et al., 2011; Sabelström et al., 2013; Tanaka & Ferretti, 2009).

Una proteína importante en el estudio de la neurogénesis y regeneración en el SNC es el factor de transcripción Sox2, ya que se ha demostrado es necesario para la pluripotencialidad de las NSC, formando parte del cóctel de factores utilizados por Takahashi y Yamanaka para reprogramar fibroblastos (Nicaise et al., 2021; Takahashi et al., 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006). Por otro lado, las células que expresan Sox2 se activan y proliferan en respuesta a un daño en estadios regenerativos, esto es acompañado por un aumento de marcadores de neurogénesis como neuro D, neurogenina 2 y doblecortina indicando que estas células podrían diferenciarse a neuronas (Muñoz et al., 2015). En conjunto estos estudios, nos permiten sugerir que los NSC/NPC pueden participar de la neurogénesis en respuesta al daño y son las responsables de la regeneración de la médula espinal en *X. laevis*.

Si consideramos que la etapa inicial en el proceso de neurogénesis es la activación de las NSC/NPC Sox2+ y que podría existir neurogénesis en respuesta al daño en animales con alta capacidad regenerativa, resulta esencial estudiar cómo se podrían modular los NSC/NPC para inducir neurogénesis y de esta forma intentar mejorar la regeneración en animales no regenerativos.

## 7. Lin28, un gen heterocrónico

Lin28 es una proteína de unión a RNA altamente conservada entre diversas especies. Esta proteína fue identificada por primera vez en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como un gen heterocrónico formando parte de una red de genes que regulan la sincronización de las transiciones larvales en el nemátodo (Victor Ambros & Horvitz, 1984; E G Moss et al., 1997). Se ha visto que cuando este gen es mutado causa defectos en el desarrollo heterocrónico del animal, provocando que *C. elegans* reitere o salte estadios larvarios completos (V Ambros, 1989; Kawahara et al., 2012; E G Moss et al., 1997; Rehfeld et al., 2015; Tzialikas et al., 2015; Vadla et al., 2012).

A diferencia de *C. elegans*, en mamíferos existen dos parálogos de Lin28 llamados Lin28a y Lin28b (Balzer & Moss, 2007; Cao et al., 2020; Yingqiu Guo et al., 2006; Eric G Moss & Tang, 2003; Rehfeld et al., 2015; Robinton et al., 2019; Tzialikas et al., 2015). Ambos homólogos, contienen dos diferentes tipos de dominios de unión a RNA, un dominio de golpe de frío y dos dominios dedos de zinc retrovirales CCHC. Estos dominios son altamente conservados entre las diferentes especies (E G Moss et al., 1997; Richards et al., 2004; Tzialikas et al., 2015).

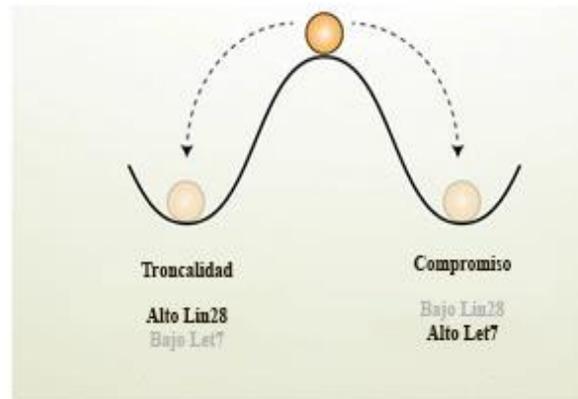
Lin28 se expresa en células troncales embrionarias humanas y de ratón, en líneas de carcinomas y en NSC/NPC (Balzer et al., 2010; Cimadamore et al., 2013; Robinton et al., 2019; D. H. Yang & Moss, 2003) y al igual que en el nemátodo, Lin28 está expresado fuertemente en tejidos en desarrollo regulando la proliferación, la auto renovación de progenitores y el destino celular. Se ha observado que a medida que la diferenciación ocurre, los niveles de ambos

parálogos de Lin28 van disminuyendo (Eric G Moss & Tang, 2003; Romer-Seibert et al., 2019; D. H. Yang & Moss, 2003). Este mismo patrón lo hemos observado en experimentos con *X. laevis*. Utilizando ensayos de hibridación in situ se determinó que Lin28a se expresa en células de la zona endimaria de la médula espinal, mismo sitio en donde se encuentran los NSC/NPC y conforme *X. laevis* avanza en la metamorfosis, la expresión de Lin28a y su parálogo Lin28b disminuye (Faunes et al., 2017).

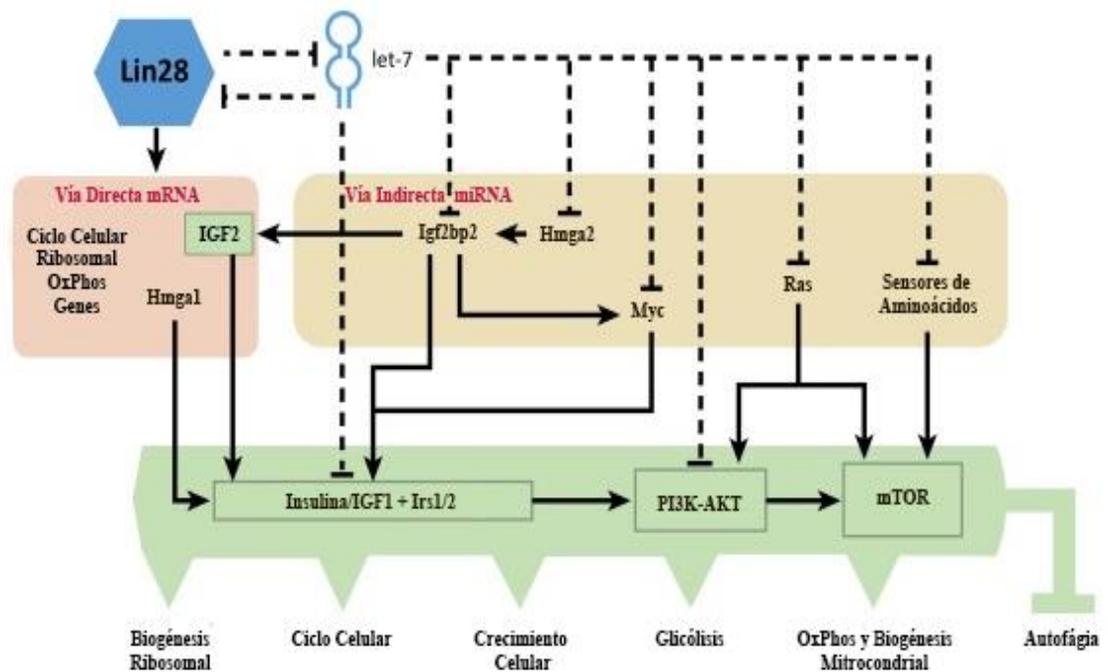
Uno de los mecanismos de acción más estudiados para la función de Lin28 es la regulación de la biogénesis de la familia de micro-RNAs Let7 (Kawahara et al., 2012; Mayr & Heinemann, 2013; Rehfeld et al., 2015; Robinton et al., 2019; Viswanathan et al., 2008). La expresión de estos micro-RNAs son necesarios para promover la diferenciación y maduración celular gracias a que regulan y silencian post-transcripcionalmente, genes relacionados con el fenotipo de las células troncales como por ejemplo Lin28 (Rehfeld et al., 2015). Por esta razón, existe un estricto equilibrio entre los niveles de Lin28 y Let7 (Fig. 3A). Es decir, la naturaleza del mecanismo de retroalimentación que existe entre ambos es un interruptor biestable con resultados excluyentes entre sí, altos niveles de Lin28/bajos niveles de Let7 y por el contrario altos niveles de Let7/bajos niveles de Lin28 (Rehfeld et al., 2015)

Sin embargo, la función de Lin28 en la célula no está limitada exclusivamente a una vía Let7 dependiente. Sino que, en el último tiempo ha crecido la evidencia de que Lin28 también puede actuar por una vía Let7 independiente y regular el ciclo celular, fosforilación oxidativa y glicolisis entre otros (Fig. 3B) (Jun-Hao et al., 2016; Polesskaya et al., 2007; Tsalikas et al., 2015).

A



B



**Figura 3: Regulación Lin28/Let7.** En A, se muestra el equilibrio biestable que existe entre los niveles de Lin28 y Let7 en la célula. Altos niveles de Lin28 promueven un fenotipo indiferenciado mientras que altos niveles de Let7 promueve la diferenciación celular. En B, esquema de las vías Let7 dependiente y Let7 independiente por las cuales Lin28 puede ejercer su función en la célula afectando diferentes componentes. Adaptado de (Jun-Hao et al., 2016; Rehfeld et al., 2015).

## **8. Efecto de la ausencia y sobre expresión de Lin28**

### **8.1. Ausencia o disminución de Lin28**

Al igual que en *C. elegans*, se han estudiado los efectos de la ausencia de Lin28 en mamíferos. Se ha observado, en ratones Lin28a<sup>-/-</sup>, una reducción en el tamaño del cerebro en estadios embrionarios, mientras que los animales Lin28a<sup>-/-</sup> / Lin28b<sup>+/-</sup> muestran similar fenotipo, pero más severo. Además, se demostró que el doble knock out de Lin28a y Lin28b genera letalidad en el embrión y está acompañado por una reducción en el tamaño del cerebro, defectos en el cierre del tubo neural, disminución de la proliferación celular y una precoz diferenciación celular. (Herrlinger et al., 2019; Robinton et al., 2019; M. Yang et al., 2015).

### **8.2. Sobre expresión de Lin28**

Por otro lado, en ratones transgénicos que sobre expresan Lin28a, se observó un incremento de la proliferación de NSC/NPC, del tamaño del cerebro, del número de vertebrae caudales y del largo de la cola. Similar efecto se encontró en animales que sobre expresaban Lin28b en cuanto al aumento del número de vertebrae y al tamaño de la cola (Herrlinger et al., 2019; Robinton et al., 2019; M. Yang et al., 2015).

Trabajos recientes demostraron que la sobre expresión de Lin28a mejora la reparación de tejidos en ratones postnatales, en particular promueve el crecimiento de los folículos capilares, acelera el re-crecimiento de cartílagos, huesos y tejido después de la amputación de los dígitos distales o de la perforación de las orejas. (Shyh-Chang et al., 2013).

En nuestro laboratorio también se ha estudiado la sobre expresión de Lin28 en ausencia y presencia de daño (amputación de extremidades). Se ha observado que la sobre expresión

sostenida de Lin28a en estadios regenerativos, retrasa la metamorfosis del animal (Faunes et al., 2017). A su vez, analizando el efecto de la sobre expresión prolongada de Lin28a en la regeneración post-amputación de la parte distal de las extremidades posteriores de *X. laevis* en estadios regenerativos, se demostró que mejoraba la regeneración de la extremidad resultando en el desarrollo de 5 dedos al compararlo con los controles sin sobre expresión, los cuales solo tenían 3 a 4 dígitos al final del experimento, cuando el animal ya estaba en estadios no regenerativo (Faunes et al., 2017). Sin embargo, la causa de una mejor regeneración podría ser debido a que los animales que sobre expresan Lin28a presentaron un retraso en su metamorfosis, por lo que se encontrarían más tiempo en estadios regenerativos comparados con sus controles.

Aún faltan estudios para definir el rol de Lin28 en la regeneración. Si bien los antecedentes anteriores podrían no ser extrapolables a la regeneración de la médula espinal, existen otros antecedentes que en conjunto nos indicarían que Lin28 podría participar de la modulación de los NSC/NPC de la médula espinal de *X. laevis* e inducir la regeneración de esta:

1) En líneas celulares de carcinoma hepático humano HepG2, se mostró que la inducción de la sobre expresión de Lin28b producía un aumento de los niveles de expresión de marcadores de células troncales como OCT4, NANOG y Sox2 (Marson et al., 2008; Yu et al., 2007) mientras que una inhibición de la expresión de Lin28b producía lo opuesto (Cheng et al., 2013).

2) La sobre expresión exógena de Lin28 fue suficiente para rescatar a los progenitores neuronales de deficiencias en la proliferación y defectos en los estadios más tempranos de la neurogénesis asociados a la pérdida (silenciamiento) de Sox2 (Cimadamore et al., 2013). Efecto

que podría explicar lo que ocurre en animales no regenerativos después de un DME en los cuales baja los niveles de Sox2 (Muñoz et al., 2015).

3) En el trabajo publicado de Barnabé-Heider et al. (2010) se demostró en ratón que, frente a un DME, existe preferentemente gliogénesis y no neurogénesis. Por otro lado, en la publicación de Muñoz et al. (2015) se observó que, frente a un DME de *X. laevis* en estadios regenerativos, existía una activación de células Sox2 acompañado por el aumento de marcadores de neurogénesis, mientras que en estadios no regenerativos existía sólo una baja tasa de proliferación.

4) La sobre expresión de Lin28a en la zona ventricular y subventricular del cerebro de ratones, producía aumento del porcentaje de progenitores Pax6 en estadios embrionarios. Este aumento del porcentaje era acompañado por un aumento de la proliferación celular, evidenciado por el aumento de la marca de EdU en la zona ventricular y subventricular (Yang et al., 2015).

5) En la zona ventricular de ratones postnatales, se vio que la sobre expresión de Lin28a producía la diferenciación de los progenitores neurales positivos para el marcador Sox2, produciendo un aumento de los neuroblastos en la región (Romer-Seibert et al., 2019).

6) El grupo de Terskikh en el 2012 demostró por medio de ensayos “*in vitro*” que Sox2 regula la expresión de Lin28, convirtiéndolo en un factor necesario para mantener los niveles endógenos de Lin28.

Teniendo estos antecedentes en consideración, se puede deducir que, si Lin28 es necesario y suficiente para promover la proliferación de NSC/NPC y que la disminución de este gen es necesaria para inducir la diferenciación, entonces, la regulación de Lin28 podría ser un

factor importante para inducir la regeneración que es mediada por células Sox2+ en la médula espinal de *X. laevis* (Muñoz et al., 2015). Resulta interesante pensar que la sobre expresión de Lin28a podría compensar la disminución de la expresión de Sox2 que experimentan las células de la médula espinal de *X. laevis* a medida que avanzan en el desarrollo (Muñoz et al., 2015)

En base a los antecedentes expuestos, nosotros consideramos que Lin28 podría regular a los progenitores neurales a través de SOX2 e inducir el destino celular para potenciar la neurogénesis en la médula espinal de *X. laevis*.

## **HIPÓTESIS**

La sobre expresión de Lin28 produce un aumento de proliferación celular y de la neurogénesis en la médula espinal de *Xenopus laevis*

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de Lin28 sobre la proliferación y neurogénesis de las células progenitoras neurales de la médula espinal en *Xenopus laevis*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar proliferación y neurogénesis en la médula espinal de *Xenopus laevis* NF50 en presencia de daño.
- 2) Determinar el efecto de la sobre expresión de Lin28a en la proliferación de progenitores neurales de la médula espinal de *Xenopus laevis* en ausencia de daño.
- 3) Determinar el efecto de la sobre expresión de Lin28a en la neurogénesis de la médula espinal de *Xenopus laevis* en ausencia de daño.

## MATERIALES

### 1. Animales y su mantención

#### 1.1. *Xenopus laevis* silvestres

Ranas machos y hembras silvestres (WT), adultos y sexualmente maduros fueron obtenidos de la compañía norteamericana Nasco (Nasco | *Xenopus Frogs*). Estos animales fueron utilizados en fertilizaciones naturales para generar embriones que son cuidados, mantenidos y crecidos hasta los estadios en los cuales se emplearán para experimentación: larvas regenerativas (NF50) y ranas juveniles no regenerativas (NF66) (Niewkoop and Faber 1994).

#### 1.2. *Xenopus laevis* transgénicos para Lin28a

Machos fundadores Lin28a, fueron generados en trabajos previos del laboratorio por el Dr. Faunes (Faunes et al., 2017) por transgénesis modificada del método de integración mediada por enzimas de restricción (Ishibashi et al., 2008).

### **1.3. Alimento para animales *Xenopus laevis***

- Larvas: Nasco Frog Brittle (Nasco, prod. num. SB09480(LM)MX) y las ranas juveniles una vez al día con
- Ranas juveniles: Frog Brittle (Nasco, prod. num. SB29028(LM)MX).
- Ranas adultas: hígado triturado.

### **1.4. Sala de mantención de animales**

- Sala de renacuajos y juveniles: sistema de filtros que elimina microorganismos, sales, minerales y cloro. Son criados en cajas plásticas de 4,5 L, con aireación artificial, temperatura constante de 21° C y sistema luz-oscuridad de 12 horas.
- Sala de adultos: cuenta con estanques de 60 L, sistema de filtros que elimina microorganismos, sales, minerales y cloro del agua, temperatura constante de 18° C y sistema luz-oscuridad de 12 horas

### **1.5. Cirugía de la médula espinal**

- Tijeras de microdissección (2 mm, Dummont, Switzerland).
- Pinzas (5 mm, Dummont, Switzerland).
- Gasas estériles.
- Placa Petri 100 mm.
- Buffer Barth 0,1X: (NaCl 88,9 mM, KCl 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM, HEPES 10 mM, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,8 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0,33 mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,41 mM, pH7,6).

- Antibióticos: ampicilina (Sigma Aldrich #A9393) y estreptomicina (Sigma Aldrich #S6501) 1X.
- Anestésico MS-222 al 0,02%.

## **2. Biología Molecular y Celular**

### **2.1. Extracción de muestras**

- Para RNA: RNAlater (QIAGEN, Alemania), RNeasy mini kit (QIAGEN, Alemania).
- Para Proteína: Ripa (Tris 25mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato 1%, SDS 0,1%).
- Inhibidores de proteasas: benzamidina 1  $\mu$ M, leupeptina 5  $\mu$ g/ml,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  200  $\mu$ M, sodio pirofosfato 200  $\mu$ M y PMSF 200  $\mu$ M.

### **2.2. RT-qPCR**

- Transcripción reversa: enzima MMLV, Buffer 5X MMLV (Promega #M1701), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM c/u (ThermoFisher #R0192), ditiotreitól (DTT) 0,1M (Merck #10197777001), albúmina de suero bovino (BSA) 1mg/mL (Sigma Aldrich #A7906), random primers (ThermoFisher #48190011) y  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas (ThermoFisher #R0581)
- RT-qPCR: SYBR Green Master Mix (Fermentas # 556050) con partidores específicos para cada gen (10mM) (ver Tabla I)
- Agua libre de nucleasas (ThermoFisher #R0581).

Las secuencias de los partidores que se han utilizado se diseñaron con el programa PrimerQuest® Tool de la empresa Integrated DNA Technologies (IDT, USA) y sintetizados en la misma empresa.

Las secuencias de los partidores utilizados para amplificar los genes de interés se resumen en la Tabla I.

**Tabla I: Secuencia de partidores utilizados**

Nombre del gen	Orientación	Sentido
Sox2	Sentido	5' ACGCTGCCTCTGTTCGCACAT 3'
	Antisentido	5' AGAGACCCACAFTTTGTCCCCC 3'
Lin28a	Sentido	5' GTACGCATGGGTTTTGGATT 3'
	Antisentido	5' CTCCTTCAAGCTGCGAAAC 3'
Nestin	Sentido	5' GCCCCTTCTGTCTGGCTGTTGA 3'
	Antisentido	5' GGCTCCACATTTGAGTGGACTCCT 3'
Ascl1	Sentido	5' CCTGTCAGCATGGACAACCTG 3'
	Antisentido	5' TTCTGCGGGAAGCAATG 3'
DCX	Sentido	5' CAGGCACTGAGCAATGAAAA 3'
	Antisentido	5' GTCAGCCAACAGAGCATCAA 3'
NeuroD1	Sentido	5' GCACTATCCTGCAGCCACTA 3'
	Antisentido	5' CTGGCAATGCACAGTCAGTT 3'
NRG2	Sentido	5' TATAACCCGACGACTCGACC 3'
	Antisentido	5' CTGTTCGCAAGTGACAATGCT 3'
NRG3	Sentido	5' AACGAGGTCTCCCCTCTCT 3'
	Antisentido	5' TCATTCGCTTGACCCTTTGC 3'

En la Tabla I, se muestra los genes analizados por qPCR en la médula espinal de *X. laevis* y las secuencias respectivas de los partidores sentido y antisentido de cada gen.

### 2.3. Western blot

- Kit comercial de ácido bicinonínico para la determinación proteica Micro BCA™ Protein Assay kit (ThermoFisher #23235).
- Buffer de carga 5x: Tris pH 6,8 1M, SDS, Glicerol y Azul de Bromofenol).

- Gel de SDS-PAGE concentrador al 12% (H<sub>2</sub>O, buffer Tris pH 6,8, acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 al 30%, SDS 10%, PSA 10% y Temed).
- Gel resolutivo (H<sub>2</sub>O, buffer Tris pH 8,8, acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 al 30% (BioRad #1610158), SDS 10%, PSA 10% y Temed).
- Buffer de corrida: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%.
- Cámara electroforética (BioRad).
- Marcador de proteínas preteñido: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher #26619).
- Cámara de transferencia (BioRad)
- Membrana de PVDF con poro de 0,45 μm (Merck #GE10600023)
- Esponjas de transferencia.
- Papel filtro Whatman.
- Buffer de transferencia: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% y metanol 20%
- Metanol 100% (Merck # 106009).
- Solución de bloqueo de TBS: Tris 200 mM y NaCl 1,37 mM, Tween 20 (Sigma Aldrich #P2287) y leche descremada al 5%
- Luminol y peroxidasa SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher # 34578) o de ser necesario el SuperSignal™. West Dura Extended
- Duration Substrate (ThermoFisher # 34075)
- Anticuerpos primarios y secundarios (ver Tabla II).

**Tabla II: Anticuerpos para western blot**

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Concentración</b>	<b>Marca</b>	<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración</b>
$\alpha$ -Lin28a	1/50	Laboratorio Dr. Harry Isaacs	$\alpha$ -Rabbit	Invitrogen 31460	1/2000
$\alpha$ -Sox2	1/1000	Cell Signaling 2748S	$\alpha$ -Rabbit	Invitrogen 31460	1/2000
$\alpha$ -Tubulina	1/50000	Abcam Ab7291	$\alpha$ -Mouse	Invitrogen 32430	1/2000

En la Tabla II, se resumen los anticuerpos utilizados para hacer inmuno detección de proteínas blanco en un homogenizado de médula espinal de renacuajos NF50 y ranas juveniles NF66.

#### **2.4. Fijación y deshidratación de médulas**

- Paraformaldehido (Merck # 1040051000) al 4% en PBS: NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM y pH 7,4.
- Sacarosa (Winkler # 38984) al 5%, 10% y 20% en PBS.
- Optimal Cutting Temperature compound (OCT) (Tissue Tek #4583).

#### **2.5. Inmunofluorescencia en criosecciones**

- Portaobjetos con carga positiva (EDIlab #H2).
- Lápiz hidrofóbico ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen (Vector Lab #H-4000).
- Tritón X-100 (Merck # T8787) al 0,2% en PBS.
- Suero fetal bovino (BSA) al 10% en PBS.
- Anticuerpos primarios y secundarios (ver Tabla III).
- Hoechst 33342 (ThermoFisher #62249).
- Medio de montaje Vectashield® (Vectors Lab #H-1000).

- Cubreobjetos (EDILab).

**Tabla III: Anticuerpos para inmunofluorescencia**

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Concentración</b>	<b>Marca</b>	<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentración</b>
$\alpha$ -Sox2	1:500	Cell Signaling 4900S	Alexa Fluor® 555 $\alpha$ -Mouse	Life technologies	1:500
$\alpha$ -NeuN	1:1000	Mendez et al, 2017	Alexa Fluor® 647 A-Rabbit	Life technologies	1:500

En la Tabla III, se resumen los anticuerpos utilizados tanto primarios como secundarios, para realización de la inmunofluorescencia en cortes transversales de médula espinal de renacuajos NF50, para detectar las proteínas de interés.

### **2.6. Análogo de timidina**

- 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) (ThermoFisher).
- Dimetilsulfóxido.
- Kit comercial Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (ThermoFisher # C10337).

### **3. Insumos generales**

- Ampicilina (USBiological #A2260)
- Estreptomicina (Sigma Aldrich #S1277-50G)
- Glicina (USBiological #A2260)
- HEPES (ThermoFisher #11344041)
- NP-40 (Winkler #BMI1225)
- Triton X-100 (USBiological #T8655)
- Tween-20 (Sigma Aldrich #9005645)
- Metanosulfonato de Tricaina (MS-222, Sigma Aldrich #A5040-100G)

- Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ , Winkler #144558)
- Cloruro de Calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Winkler #CA-0520)
- Cloruro de Potasio (KCl, Winkler #7447407)
- Cloruro de Sodio (NaCl, Merck #7647145)
- Deoxicolato Sódico (Sigma Aldrich #D6750-25G)
- Fosfato Disódico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Winkler #1048731000)
- Fosfato Monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck #1048731000)
- Sulfato de Magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Merck #100344998)
- Nitrato de Calcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Winkler #CA-0535)
- Tris base (Merck #BM1225)
- L-Cistena (Sigma Aldrich #C7352-100G)
- Doxiciclina (Sigma Aldrich # D9891-5G).
- Sacarosa (Winkler #38984)

#### **4. Equipos y Programas**

- Microscopio confocal fluoview™ FV10i (Olympus, Japón).
- Microscopio estereoscópico fluorescente SMZ1500 (Nikon, USA).
- Criostato CM1850 (Leica, USA).
- Espectrofotómetro para microplacas Epoch (Biotek, USA).
- Termociclador Eco™ Real-Time PCR System (Illumina).
- Microinyector IM 300 Microinjector (Narishige, Japón).

- Fotodocumentador iBright FL1500 Imaging Systems (ThermoFisher).
- Microscopio estereoscópico Wild M8 (Leica, USA)
- Fuente de luz externa CLS 150 XC (Leica, USA)
- El procesamiento de imágenes en plano Z en diferentes canales se realiza con el programa gratuito ImageJ/FIJI (<https://imagej.nih.gov/>).
- El ajuste del brillo, contraste y armado de figuras se realiza con el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).
- Los análisis de datos, estadísticas y gráficos se realizan con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## MÉTODOS

### 1. *Xenopus laevis*

#### 1.1. Fertilización natural de *Xenopus laevis* silvestre

Una rana hembra WT y un macho WT son pre-inyectados con 50U de la HGC tres días antes del apareamiento. Posteriormente, para el apareamiento, unas horas antes la hembra es inyectada con 500 U de hGC y el macho con 300 U de HGC se colocan en una caja con 2 litros de Barth 0,1X, previamente enfriado a 16°C por 30 minutos. Finalmente son dejados toda la noche a 18°C para el apareamiento.

A la mañana siguiente, se recogen los huevos y se les elimina la capa gelatinosa usando cisteína 2% (en Barth 0,1X). Una vez desgelatinizados, los huevos fertilizados son seleccionados (desechando mal formaciones y muertos), se dejan en una placa Petri de 10 cm con 50 mL de Barth 0,1X en un aforo de 100 huevos aproximadamente). Al final del día, la pareja se separa y se devuelve al estanque respectivo en la sala de ranas. Los embriones se

limpian una vez al día, cambiando el medio Barth 0,1X y descartando los embriones muertos o mal desarrollados. Los embriones se mantienen en la incubadora a 18°C por una semana para pasar posteriormente a la sala de renacuajos para su mantención y crecimiento (Edwards-Faret et al., 2018).

### **1.2. Fertilización natural de *Xenopus laevis* Lin28a**

Para la obtención de animales transgénicos Lin28a, machos fundadores Lin28a se cruzan con hembras WT siguiendo el mismo protocolo descrito en el paso anterior.

La descendencia es seleccionada entre animales positivos (expresan el gen transgénico) y animales negativos (no expresan el gen transgénico), mediante la observación del ojo entre los NF46 y NF50 con una lupa fluorescente para la visualización de la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP). Los animales que no contienen el inserto del transgen tienen los ojos de color negro (Faunes et al., 2017).

### **1.3. Crecimiento y manipulación de *Xenopus laevis***

Los estadios del desarrollo se definen de acuerdo con la tabla de referencia de *Xenopus laevis* de Nieuwkoop y Faber (Nieuwkoop & Faber, 1994).

Desde el NF44 post-fertilización hasta el NF56, los animales se mantienen en una densidad de 50 animales por caja de 4 litros con agua filtrada, oxigenación artificial, a 20-21 °C y ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

Los animales son alimentados una vez al día con 0,5 mg/animal del alimento pulverizado para larvas. En estas condiciones, los embriones llegan al NF50 en aproximadamente 3 semanas

post-fertilización y a NF56 en 6 semanas aproximadamente. En esta última etapa, los animales son mantenidos a una densidad de 40 renacuajos por caja con agua libre de cloro.

A partir del NF61, los animales son mantenidos en una densidad de 8 animales por caja y son alimentados diariamente con pellet. La frecuencia y la cantidad de la alimentación, temperatura del agua y el ciclo luz/oscuridad se mantienen como se mencionó previamente. En estas condiciones, los animales completan la metamorfosis y llegan a NF66 en 2 a 3 meses después de la fertilización.

## **2. Cirugía de la médula espinal: Transección**

### **2.1. Animales NF50**

Animales de NF50 se incuban en 50 ml de Barth 0,1X con anestésico MS-222 al 0.02%, durante 2 minutos. Una vez anestesiados se transfirieren e inmovilizan sobre gasa estéril y húmeda en una placa de Petri.

Bajo la lupa estereoscópica, se realiza la transección de la médula espinal en la zona media del segmento torácico, esto significa que el corte está anatómicamente por sobre el nivel central del abdomen. Para la transección completa de la médula espinal se realiza un corte, con tijeras de microdissección, en forma perpendicular al eje cefalocaudal a través de la médula espinal (zona dorsal del animal), cortando la piel y el músculo hasta lograr un corte completo de la médula (pérdida total de continuidad). Para el caso de los animales controles (sham), se realiza el mismo procedimiento descrito anteriormente, sin dañar la médula, es decir, solo se corta la piel y el músculo del animal (Edwards-Faret 2017). En ambas condiciones, no es

necesario cerrar la herida, ya que, los animales en NF50 regeneran la piel por sí mismos a los pocos días (Muñoz et al., 2015).

Terminada la operación se deja un máximo de 10 animales, por condición, en cajas plásticas con 500 mL de solución Barth 0,1X suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina). Una vez que la anestesia deja de hacer efecto, son trasladados a la sala de renacuajos con aireación continua, alimentación y cambio de buffer día por medio.

### **3. Biología Molecular**

#### **3.1. Extracción de mRNA**

Para aislar la médula en animales NF50 y extraer el RNA, los animales son eutanasiados con MS-222 al 1% (metodología aprobada por el comité de bioética de la Pontificia Universidad Católica de Chile). Una vez dormidos los animales se realizan dos cortes perpendiculares a la médula, el primero en el origen de esta y otro al llegar a la mitad de la extensión de la cola. Con ayuda de las pinzas cerradas se atraviesa el tejido justo debajo de la médula en el segmento medio de la porción cortada y se abren para rasgar el tejido sin afectar la integridad de la médula. Esto originará un espacio en el que se podrá ver la médula y con la ayuda de la pinza se aísla del resto del tejido.

En el caso de los NF66, los animales son anestesiados con MS222 1% para posteriormente realizar una dislocación cervical con tijera haciendo un corte profundo para desconectar el cerebro del resto del cuerpo. Posteriormente, se realiza un corte en la piel y el músculo para exponer la columna vertebral, y una vez expuesta, con la ayuda de la pinza se saca

todo segmento vertebral con la médula espinal adentro. Una vez obtenido el trozo y con la ayuda de la tijera se corta las vértebras exponiendo el tejido de la médula espinal.

Los segmentos de médula tanto de NF50 como de NF66 son puestos en RNAlater y mantenidos a 4°C por máximo 1 semana hasta realizar la extracción.

Para la purificación del RNA total se utiliza el kit comercial siguiendo las especificaciones del fabricante. Para ello se pasan las médulas a un tubo eppendorf con buffer de lisis y se realiza una homogenización mecánica con un vástago plástico. Después el contenido homogenizado se pasa por una columna de filtrado y es lavado con los buffers de lavados incluidos en el kit. Finalmente, se hace un tratamiento con DNAasa y se eluye la columna con 30 µL de agua. El RNA extraído es mantenido a -20 hasta su uso.

El RNA extraído se cuantifica utilizando la relación que establece que 1 OD a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA. El grado de pureza del RNA obtenido se determina utilizando la razón A260/A280 (rango 1.8-2.0). El RNA total extraído se cuantifica usando la placa Take3 con el espectrofotómetro para microplacas Epoch (Peñailillo et al., 2021).

### **3.2. Síntesis de cDNA (RT-PCR)**

El cDNA se sintetiza a partir del RNA total extraído desde muestras de médula espinal de renacuajos NF50 o ranas juveniles NF66. En un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL se adicionan 200 ng de RNA total (purificado en el paso anterior), 4 µL de buffer de reacción enzima RT 5x MMLV, 1 µL de dNTPs 10 mM, 2 µL de DTT 10 mM, 1 µL de BSA 1 mg/mL, 1 µL de Random Primers 50 µg/mL y 1 µL de transcriptasa inversa MMLV completando el volumen final de 20

$\mu$ L con agua ultrapura. Las muestras se incuban a 42°C por 2 hora y finalmente, se guarda la alícuota a -20 °C hasta su utilización (Edwards-Faret et al., 2018).

### **3.3. qPCR**

Para determinar la expresión diferencial de transcritos por qPCR, se utilizan tres réplicas biológicas independientes, preparadas cada una con 15 animales NF50 o con 5 ranas juveniles de NF66 en Power SYBR Green. La reacción se lleva a cabo en el termociclador Illumina en las siguientes condiciones: 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min entre 50°C a 60°C, 1 min a 72°C; y por último una extensión de 10 min a 72°C (Edwards-Faret et al., 2018).

### **3.4. Extracción de proteínas**

Para determinar la expresión de proteínas de nuestro interés en la médula espinal de *X. laevis*, se aíslan las médulas de animales NF50 y NF66 según lo descrito en la sección de Extracción de mRNA, se realizan tres replicas biológicas independientes, preparadas cada una con 15 animales NF50 o con 5 ranas juveniles de NF66.

Tras obtener la médula, se sumergen inmediatamente el buffer RIPA con los inhibidores de fosfatasa y proteasas. Se repite este proceso hasta aislar la médula de todos los animales del grupo. Posteriormente, el tejido es lisado manualmente con la ayuda de un homogeneizador plástico y luego se centrifugan por 5 min a velocidad máxima a 4 °C. El sobrenadante obtenido se traspara a un tubo estéril de 1,5 mL y se guarda a -20 °C hasta su utilización (Muñoz et al., 2015).

Para la cuantificación de proteína, se utiliza del kit comercial Micro BCA Protein Assay Kit que requiere de 2,5  $\mu$ L del extracto. La determinación de la concentración en cada muestra se hace siguiendo las instrucciones del fabricante, midiendo la absorbancia a 562 nm e interpolando los valores en una curva de calibración de BSA realizada en paralelo.

### **3.5. Electroforesis y Western blot**

Se cargan 50  $\mu$ g de proteínas en geles de poliacrilamida al 12% para separar en una electroforesis vertical en presencia de dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE). La corrida se realiza inicialmente a 70 V por 30 minutos o hasta que el frente de migración llegue al gel resolutivo y después se corre por 2 horas a 120 V o hasta que el frente de migración caiga.

Una vez finalizada la corrida, se arma el sándwich para realizar la transferencia. En orden desde el polo positivo (lado transparente del casete de transferencia) una esponja, dos papeles filtros, la membrana previamente activada con metanol al 100%, el gel de electroforesis, dos papeles filtros y una esponja. Al cerrar el casete, hacia el lado negro del mismo (polo negativo) debe quedar el gel mientras que al lado transparente (polo positivo) debe quedar la membrana. Las proteínas fraccionadas se transfirieren por 2 horas a 350 mA a una membrana de PDVF (activada previamente con metanol al 100%).

Una vez finalizada la transferencia, se lava la membrana con agua destilada, se sumerge nuevamente en metanol al 100% y se seca en estufa a 60 °C por 5 minutos. Posteriormente, la membrana es activada con una solución de metanol al 30% y se incuba con el anticuerpo primario, el cual está diluido en una solución de TBS-Tween 20 al 0,1% (TBST) con leche descremada al 5%, en agitación constante a 4°C durante toda la noche.

Finalizada la incubación del anticuerpo primario, se procede a realizar 3 lavados de 10 minutos con TBST y se incuba la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG-HRP diluido en solución de TBST con leche descremada al 5% (1/2.000) por 2 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, la membrana se lava 3 veces por 10 min con solución TBST y una vez con TBS por 10 min (Muñoz et al 2015)

La membrana se revela mediante quimioluminiscencia utilizando los kits comerciales ECL Western Super Signal West pico o el kit Super signal West Dura en conjunto con el fotodocumentador iBright Imaging Systems.

## **4. Biología Celular**

### **4.1. Inmunofluorescencia**

#### **4.1.1. Fijación de animales, inclusión y criosecciones de la médula espinal**

Animales NF50 son fijados en PFA al 4% en PBS 1X durante toda la noche a 4°C y con agitación constante. Posteriormente, el tejido es delimitado para acotar la zona a seccionar, se deshidrata, incluyendo el tejido en soluciones crecientes de sacarosa al 5%, 10% y 20 % por una hora cada una, seguido de la incubación de las muestras por una hora, en una solución de OCT: Sacarosa al 20% (1:1). Luego, las médulas son traspasadas a OCT puro por una hora. Terminado este periodo, se cambia el OCT y se procede a congelar el tejido con nitrógeno líquido y los bloques son guardados a -80°C hasta realizar las criosecciones. Se realizan cortes transversales (secciones) de 10 µm cada uno y se ubican en portaobjetos cargados, los cuales son almacenados a -80°C hasta su uso (Muñoz et al., 2015).

#### **4.1.2. Inmunofluorescencia en criosecciones**

Las secciones de la médula espinal de NF50, son hidratadas por 10 minutos en PBS 1X, permeabilizadas por 10 minutos en PBS 1X con Tritón X100 0,2% (PBST 0,2%) y, posteriormente, bloqueados por una hora con PBST 0,2% suplementado con suero de cabra al 10% inactivado.

Luego, los cortes son incubados con anticuerpo primario diluido en PBST al 0,2% durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda para evitar que se sequen. El detalle de los anticuerpos primarios utilizados se resume en la Tabla III.

Finalizada la incubación del anticuerpo primario, se procede a lavar los cortes 3 veces con PBST 0.2% por 10 minutos cada vez y se incuba con el anticuerpo secundario diluido en PBST al 0,2% a temperatura ambiente en solución de bloqueo y en cámara húmeda para evitar que los cortes se sequen. Se lavan nuevamente 3 veces en PBST 0.2% por 10 minutos cada vez y se incuban en una contratinción nuclear de Hoechst (1:20000) por 10 minutos para teñir los ácidos nucleicos.

Finalmente, se secan los bordes de los portaobjetos y se agrega medio de montaje Vectashield® sobre los cortes para cubrir con un cubreobjetos y sellar los bordes, se mantienen en oscuridad hasta su análisis.

## **5. Estudio de la Proliferación**

### **5.1. Inyección intracelómica de EdU**

Animales NF50 silvestres y transgénicos para Lin28a se inyectan intracelómicamente con 1  $\mu$ l de EdU de 10 mg/ml. La solución de EdU es preparada en DMSO y agregando agua destilada hasta lograr una concentración final de 50 $\mu$ M de EdU (Edwards-Faret et al., 2018). Posterior al pulso de EdU, los animales se mantienen en la sala de renacuajos en cajas de plástico de 4 L con solución Barth 0,1X a 20-21° C, oxígeno y alimentación normal.

### **5.2. Caza del pulso de EdU**

Para realizar la caza de EdU, los animales son eutanasiados con anestesia profunda de MS-222 al 1%, luego son fijados en PFA 4% toda la noche, para luego obtener criosecciones transversales de 10  $\mu$ m. Los detalles de inclusión y cortes están descritos en la sección de métodos.

### **5.3. Reacción de Click-iT**

Los portaobjetos con las secciones de la médula espinal obtenidas desde animales NF50 tratados con EdU, son revelados mediante el kit comercial Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging para la detección del EdU. Para esto, se prepara un coctel de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Click-iT® EdU Imaging Kits, Molecular Probes, Invitrogen). Las secciones son lavadas e hidratadas con BSA al 3% en PBS por 10 minutos, para posteriormente permeabilizarlas con BSA al 3% en PBST al 0,5% por 10 minutos. Luego, se realiza un lavado con BSA al 3% en PBS por 10 minutos y se incuban por 30 minutos a

temperatura ambiente con el coctel de reacción previamente preparado. Para finalizar, se realiza un nuevo lavado con BSA al 3% en PBS 1X. En este punto, los núcleos pueden ser teñidos por medio de incubación con Hoechst y posterior montaje con Vectashield® o se puede proseguir con el protocolo inmunofluorescencia para realizar la co-detección de proteínas de interés, según protocolos descritos previamente en la sección de métodos. Los cortes son guardados a 4° C, hasta su análisis por microscopía confocal.

## **6. Microscopía y procesamiento de imágenes**

Todos los cortes son analizados utilizando microscopía confocal. Las imágenes obtenidas se procesan utilizando el programa ImageJ/Fiji para la asignación de color según canal y la superposición de los stacks de la proyección en Z de los cortes obtenidos. Una vez terminado el proceso anterior, se arman las figuras utilizando el programa Adobe Photoshop CS6®.

La cuantificación de las células en proliferación se realiza de forma manual utilizando la herramienta para contar de ImageJ/Fiji en cada uno de los diferentes canales del mismo corte. Se cuantifica el número de células desde el extremo más rostral obtenido y hasta el sitio más caudal. Para equiparar las mediciones en cada médula se utiliza el promedio de las razones obtenidas entre total de núcleos y el número de células positivas para EdU en cada imagen de la médula espinal.

## **7. Estadística**

Todos los análisis estadísticos se realizan con el programa GraphPad Prism 7. Para los análisis de proliferación de las células y neurogénesis en animales silvestre se utiliza t-test, mientras que en animales transgénicos se utiliza la prueba ANOVA de una vía. En el caso del análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR se utilizó la prueba t-test.

## **8. Bioética y Bioseguridad**

Todos los procedimientos con animales de esta tesis fueron aprobados y certificado por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile con resolución ID de protocolo número 180313002.

## RESULTADOS

### 1. Respuesta de las células Sox2+ al daño a la médula espinal en estadios regenerativos.

#### 1.1. Proliferación de las células Sox2+ de la médula espinal de *Xenopus laevis* en respuesta al daño.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que las células progenitoras neurales Sox2+ residentes de la zona ependimaria de la médula espinal, son capaces de responder frente a un daño en la misma. Producto del daño, las células Sox2+ ingresan al ciclo celular para comenzar a proliferar (Muñoz et al., 2015).

En los primeros estudios realizados por nuestro grupo, se utilizó el análogo de timidina 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) para realizar un seguimiento de las células Sox2+ que ingresaban al ciclo celular. Este compuesto era diluido en el agua para que los animales lo incorporaran a su organismo al momento de alimentarse o respirar (Muñoz et al., 2015).

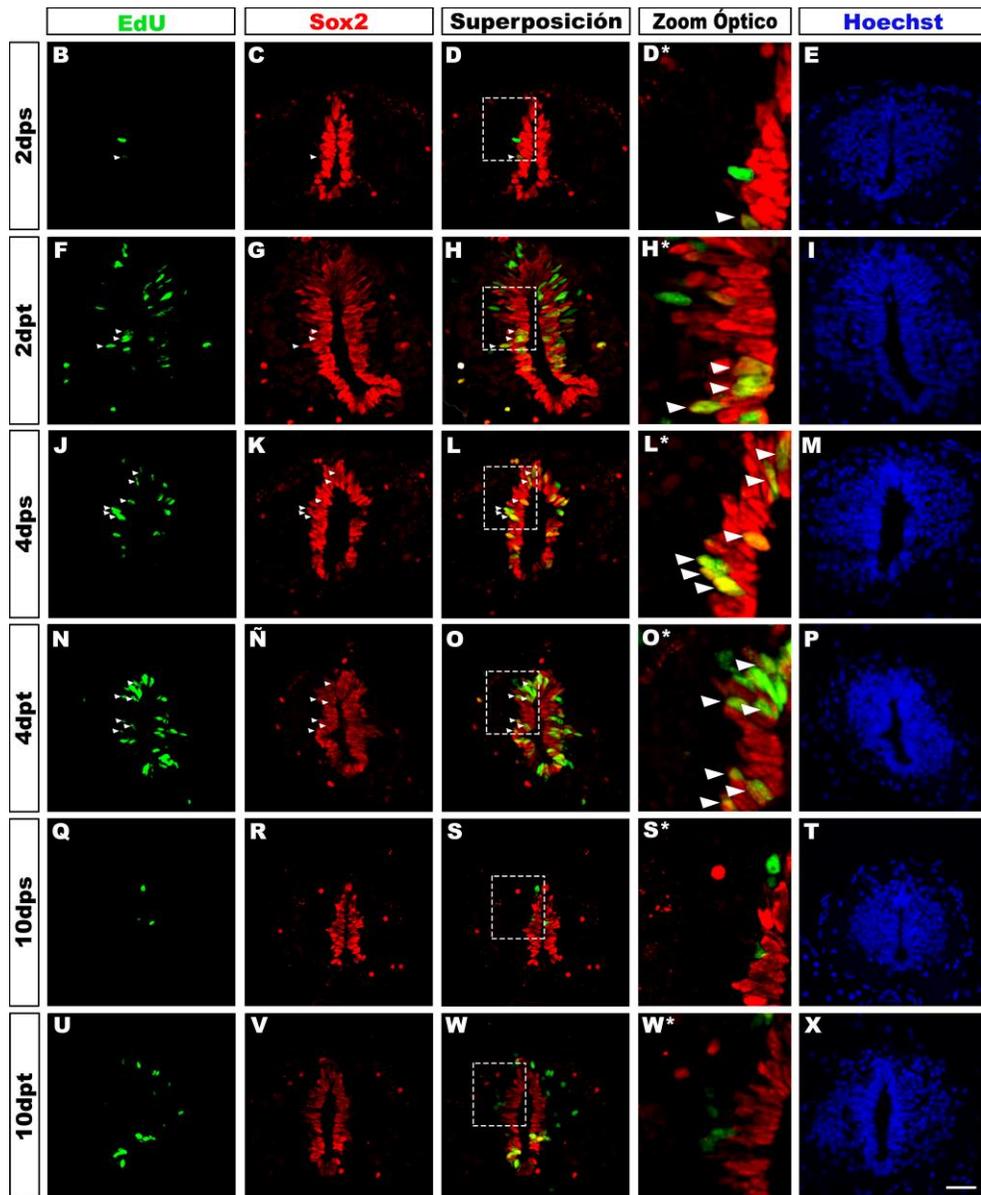
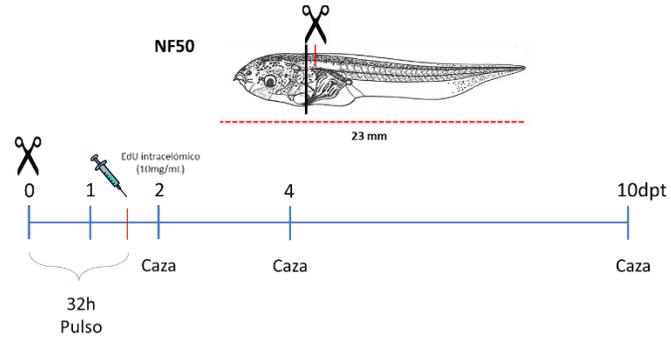
Nuestro diseño experimental consistió en validar la metodología de ensayos de pulso y caza, pero esta vez, usando 5-etinilethynyl-20-deoxiuridina (EdU), administrado de forma más controlada a través de inyecciones intracelómicas y reduciendo la cantidad utilizada al no incorporar este análogo en el medio de mantención. Para esto, animales en estadio NF50 fueron inyectados con EdU (10 mg/mL) a una equivalencia de 1 $\mu$ L por cada 100 g de masa del animal.

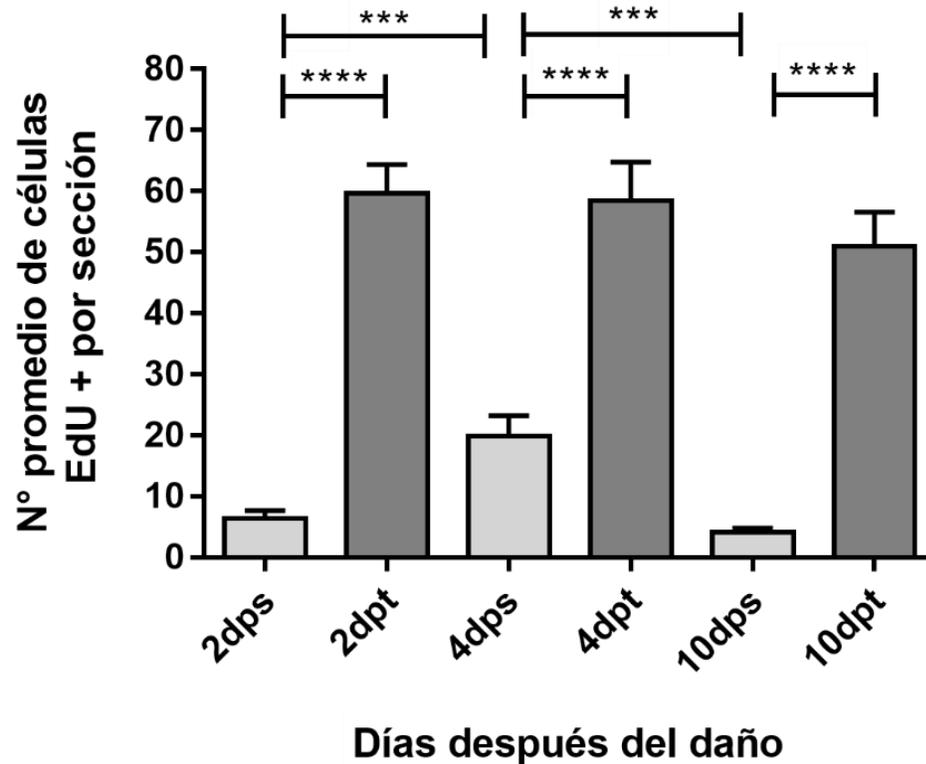
Para detallar el efecto del daño en la médula espinal de *X. laevis*, en el día inicial del tratamiento se realizó una transección de la médula y 32 horas después un pulso de EdU (Fig. 4A). Observamos que a los 2 días posterior a la transección (2dpt), se incrementó la marca de EdU al compararlo con su control de 2 días sham (2dps) llegando a cerca de 60 células en promedio por sección, siendo la marca localizada preferentemente en la zona endimaria. Del mismo modo ocurrió en los siguientes días al evaluar la transección con los controles sham. El aumento visto a los 2dpt se mantuvo elevado hasta los 10dpt que es cuando se finalizó el experimento (Fig. 4B, F, J, N, Q, U), que aún era posible encontrar hasta 50 células EdU+ en promedio. Al realizar el análisis estadístico del número promedio de células EdU(+) por sección, evidenciamos que en todos los casos existió un aumento significativo de la señal de EdU al comparar la condición dpt versus la condición dps y siempre con la marca de EdU+ ubicada principalmente en la zona cercana al canal central (Fig. 5).

Cuando se analizaron los progenitores neurales Sox2+ (Fig. 4C, G, K, Ñ, R, V), se observó una deformación del canal central producto de la transección especialmente a los 2dpt (Fig. 4G) la cual se fue normalizando a medida que transcurrió el tiempo (Fig. 4Ñ y V). La co-localización de la expresión de Sox2 en las células que se encontraban en proliferación mostró

**Figura 4: Aumento de la proliferación de progenitores en respuesta al daño.** A, protocolo utilizado para la realización del experimento en renacuajos NF50, la línea roja indica la zona de transección en la médula espinal y la línea negra la zona que se presenta en las figuras (B-X). Imagen representativa del efecto del daño en la médula espinal de *X. laevis* NF50 a los 2, 4 y 10 dpt (B-X). Se observa un aumento de la marca Edu+ (verde) a los 2, 4 y 10 dpt al compararlo con sus respectivos controles dps (B, F, J, N, Q, U). Inmunofluorescencia contra Sox2 (rojo), marcador de progenitor neural en la médula (C, G, K, Ñ, R, V). A los 2dpt, se presenta una deformación de la médula espinal producto de la transección y regeneración de esta (posible tubo neural secundario, G y Ñ). Superposición de la marca Edu+ con la marca Sox2+ (D, H, L, O, S, W). Los cuadrados punteados, señalan la imagen aumentada ópticamente (D\*, H\*, L\*, O\*, S\*, W\*). Las flechas blancas señalan las células Sox2+/EdU+. Se observa que las células que proliferan en respuesta al daño en la médula espinal son progenitores neurales Sox2 (amarillas). Marca nuclear Hoechst (E, I, M, P, T, X). Barra de escala 50  $\mu$ m.

A



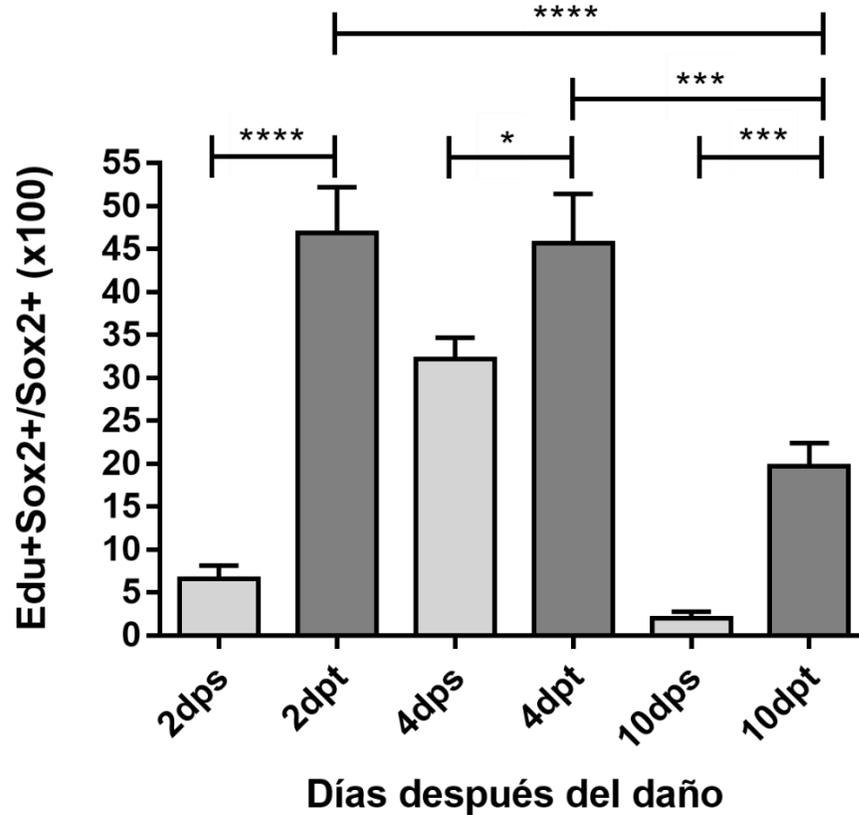


**Figura 5: Aumento de la proliferación celular en la médula espinal en respuesta al daño.** Cuantificación del número de células EdU+ promedio de criosecciones histológicas de 10  $\mu\text{m}$  de médula espinal de *X. laevis* NF50 tipo silvestre de la inmunofluorescencia de la figura 1, a los 2, 4 y 10 dpt o su control sham e inyectado con EdU 32 horas después de la operación. El daño en la médula espinal produce un aumento en el número de células que se encuentran proliferando a los 2, 4 y 10 días posteriores al daño, al comparar con sus respectivos controles del mismo día. Se realizó un t-students para el análisis estadístico. \*\*\* $P < 0,0006$  y \*\*\*\* $P < 0.0001$ . Este experimento corresponde a  $n=3$  de réplicas biológicas.

que la mayoría de las células que ingresaron al ciclo celular, por lo tanto, EdU (+), fueron también positivas para el marcador de progenitores neurales Sox2 (Fig. 4D, H, L, O, S y W). En D\*, H\*, L\*, O\*, S\*, W\*, se presenta un aumento digital de la zona dorsal izquierda de la médula demarcada en D, H, L, O, S y W, en donde las cabezas de flecha blancas señalan aquellas células que son doblemente positivas para EdU/Sox2 (Fig. 4D\*, H\*, L\*, O\*, S\*, W\*)

Al determinar el porcentaje de células que eran doblemente positivas para Sox2 y EdU sobre el total de células Sox2, se observó que, producto del daño, aumentó el porcentaje de este tipo de células que ingresaron al ciclo celular (Sox2+/EdU+) en la médula espinal, al comparar la condición de transección con la sham a los 2 días representando casi un 50% de las células Sox2 totales encontradas en la médula (Fig. 6). Este efecto fue muy similar a los 4dpt donde aún sobre el 45% de las células Sox2+ eran también EdU+ a pesar de que fue disminuyendo a medida que avanzaron los días, sin embargo, esta diferencia entre las condiciones siguió siendo significativa hasta los 10dpt, aunque en este último día cercano al 20% de las células Sox2+ eran también EdU+ (Fig. 6).

A pesar de que vemos este aumento en los animales NF50 a los 4dps, es importante recalcar que en presencia de daño la proliferación de los progenitores en la médula espinal aumenta mucho más, siendo significativo hasta los 10 dpt (Fig. 6).



**Figura 6: Aumento de la proliferación de progenitores neurales en respuesta al daño.** Cuantificación del número de células EdU+/Sox+ del total de células Sox2+ de la inmunofluorescencia mostrada en la figura 1, a los 2, 4 y 10 días posteriores a la transección e inyectado con EdU 32 horas después de la operación. Se encontró un aumento significativo de células con la doble marcación a los 2, 4 y 10 dpt, al compararlo con su control dps. A los 10 días se observa una disminución de células EdU+/Sox2+ con respecto a los días anteriores. Se realizó un t-students para el análisis estadístico. \* $P < 0,04$ , \*\* $P < 0.012$ , \*\*\* $P < 0.0002$  y \*\*\*\* $P < 0.0001$ . Este experimento corresponde a  $n=3$  de réplicas biológicas.

## 1.2. Neurogénesis en la médula espinal de *Xenopus laevis* en respuesta al daño.

Por estudios previos realizados en nuestro laboratorio, consideramos que uno de los mecanismos por los cuales *X. laevis* es capaz de regenerar la médula espinal después de un daño, es la neurogénesis. Sin embargo, este mecanismo se sugirió a través de microscopía de 2 fotones y morfología sin utilizar un marcador de neuronal para afirmar que realmente lo que se observaba era una neurona (Muñoz et al., 2015). En ese momento no se contaba con un marcador de neuronas diferenciada para demostrar la neurogénesis porque los anticuerpos probados de otras especies no funcionaban en nuestro modelo. Debido a esto, desde el laboratorio se diseñó y solicitó a una empresa generar un anticuerpo contra NeuN específico para *Xenopus* (Méndez-Olivos et al., 2017).

Basado en experimentos previos, nos propusimos confirmar que existía neurogénesis a través de la técnica de pulso y caza de EdU, y evidenciar la existencia de neuronas maduras EdU+ al cabo de un tiempo después del daño. Para esto, animales NF50 fueron transectados en el día inicial de ensayo, y se realizó un pulso intracelómico de EdU 32 horas después (Fig. 7A). La caza se realizó a los 2, 4 y 10dpt (Fig. 7B –X).

A los 2dpt, acompañado de un aumento de la incorporación de EdU (Fig. 7F) comparado con su control sham (Fig. 7B), se observó un aumento en el porcentaje de células doblemente positivas para NeuN+/EdU+ que llegan a superar el 5% de las células NeuN+ totales encontradas en la médula (Fig. 7H,H\* y Fig. 8) con respecto con su control 2dps que ronda el 1% de células doblemente positivas (Fig 7D,D\* y Fig. 8). A pesar de que la mayoría de las

células en proliferación se encontraron concentradas preferentemente cerca de la zona ependimaria de la médula espinal en donde no está localizado NeuN (Fig. 7H yH\*).

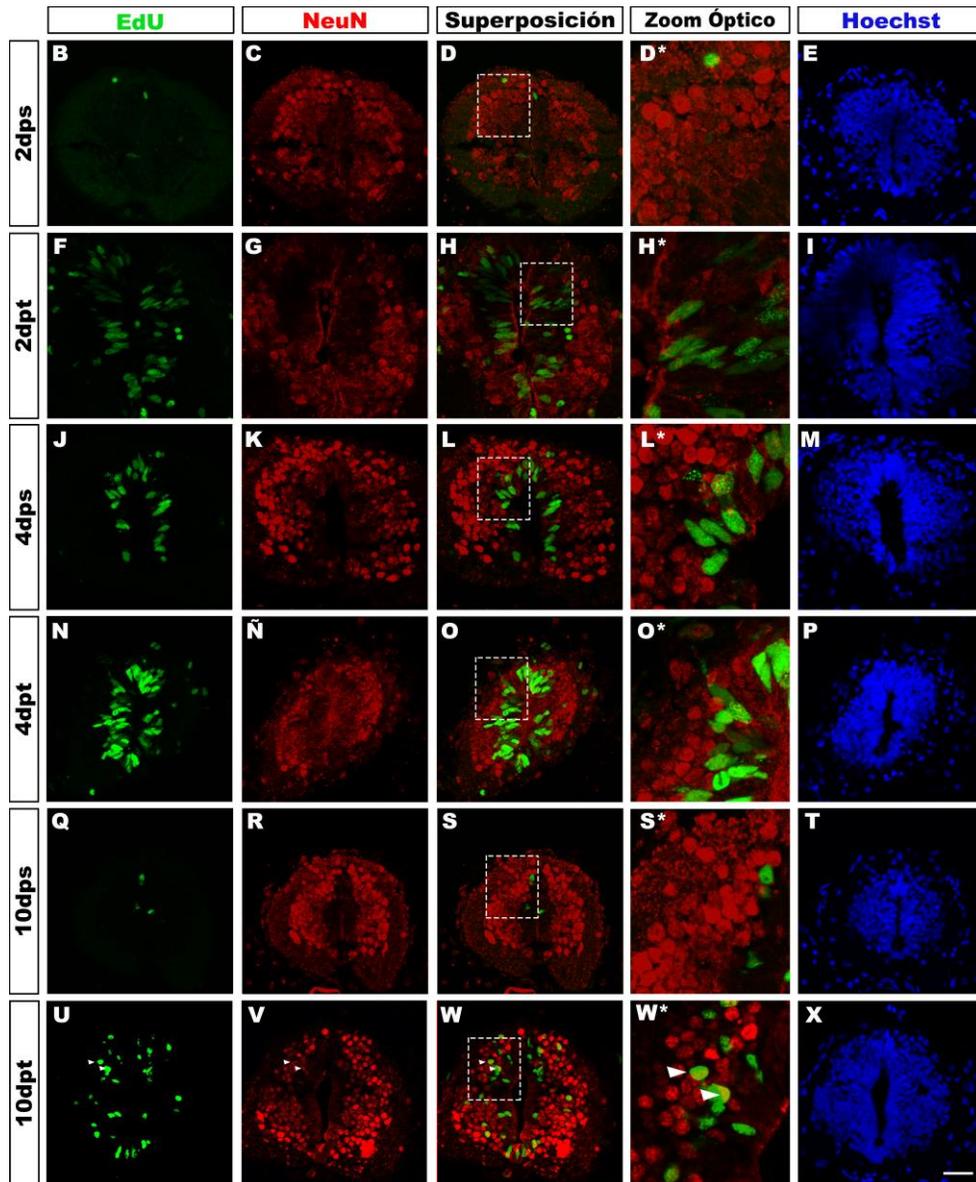
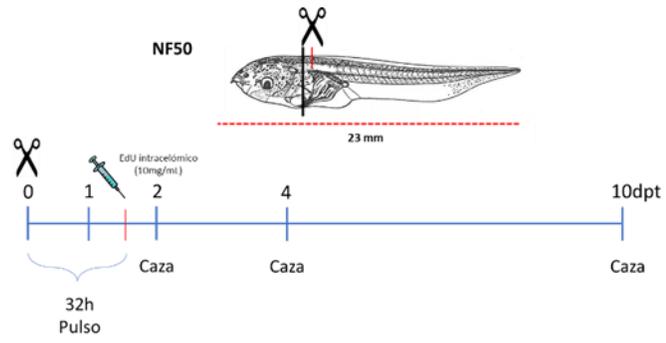
Similar efecto se observó a los 4dpt, donde se mantiene el aumento del porcentaje de células EdU+/NeuN+ el cual era cercano a un 5% del total de células NeuN+ (Fig. 7O, 7O\* y Fig. 8), al comparar con su control sin daños del mismo día que era mínimo el porcentaje de células doblemente positiva para EdU+/NeuN+ (Fig. 7L, L\* y Fig. 8A). Al igual que a los 2dpt, la marca de EdU se encontraría también ubicado en la zona adyacente al canal central.

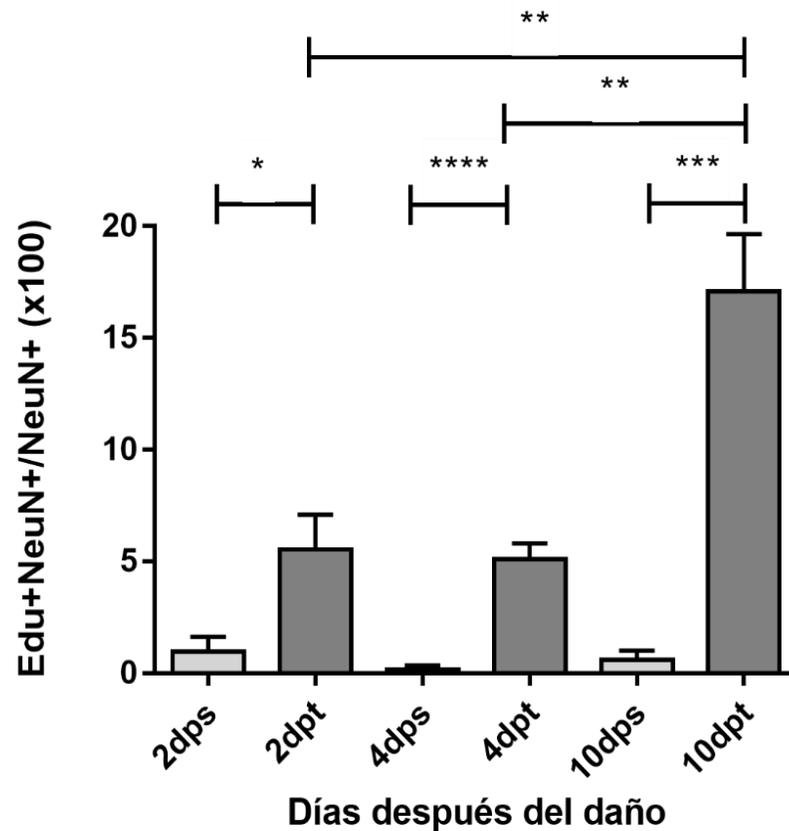
En forma importante, encontramos que a los 10 dpt existió un gran aumento de la cantidad de células con la doble marca de EdU+/NeuN+ (Fig. 7W, W\* y Fig. 8), sobrepasando el 15% del total de células NeuN detectadas (Fig. 8), en comparación a su control sham que al igual que en los casos anteriores era cercano al 1% (Fig. 7S, S\* y Fig. 8).

En este último día de experimentación, la marca de EdU estaba más alejada de la zona ependimaria (Fig. 7W y W\*) al compararlo con los 2dpt (Fig. 7H\* y H\*), posiblemente como un estado transitorio de maduración neuronal. Se observó el mismo efecto del daño en la médula espinal, en las 3 réplicas biológicas independientes que se realizaron.

**Figura 7: Neurogénesis en la médula espinal en respuesta al daño.** Protocolo utilizado para la realización del experimento en el renacuajo de NF50, la línea roja indica la zona de transección en la médula espinal y la línea negra la zona que se muestra en la figura B-X (A). Imagen representativa del efecto del daño en la médula espinal de *X. laevis* NF50 a los 2, 4 y 10 dpt (B-X). Se observa que existe un aumento de la marca Edu+, a los 2, 4 y 10 dpt al compararlo con su control dps (B, F, J, N, Q, U). Inmunofluorescencia contra NeuN, marcador de neuronas maduras (C, G, K, Ñ, R, V). Superposición de la marca Edu+ con la marca NeuN+, se puede observar que entre los 4 y 10 dpt, existe una mayor presencia de ambas señales en amarillo (D, H, L, O, S, W). Marca nuclear Hoechst. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

A





**Figura 8: Aumento de la neurogénesis en la médula espinal en respuesta al daño.** Cuantificación del número de células EdU+/Sox+ por sección de la inmunofluorescencia mostrada en la figura 4, a los 2, 4 y 10 días posteriores a la transección e inyectado con EdU 32 horas después de la operación, en criosecciones histológicas de 10  $\mu$ m. Se observa un aumento significativo del porcentaje de células Edu+/NeuN+ a los 2, 4 y 10 dpt al compararlo con sus respectivos controles dps. Además, existe un mayor aumento a los 10 dpt al compararlo con los 2 y 4 dpt. Se realizó un t-students para el análisis estadístico. \*P<0,03, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0005 y \*\*\*\*P<0.0001. Este experimento corresponde a n=3 de réplicas biológicas.

## 2. Caracterización de los niveles de Lin28a en animales transgénicos.

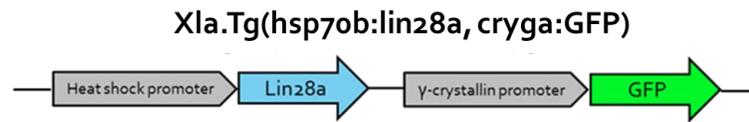
Una vez que determinamos que en los animales del tipo silvestres (WT) se activaba la neurogénesis en respuesta al daño, nos propusimos estudiar el efecto de lin28a en la neurogénesis debido a que se había observado que Lin28a mejoraba la regeneración de extremidades en *X. laevis* (Faunes et al., 2017).

Con este propósito, decidimos utilizar animales transgénicos para Lin28 que previamente se utilizaron en nuestro laboratorio (Faunes et al., 2017). En ellos caracterizamos la sobre expresión de Lin28a inducida con solo un golpe de calor (HS), ya que, la expresión de Lin28a, en estos animales, está regulada por el promotor de la “*heat shock protein*” (Fig. 9A). Para esto, un macho adulto Lin28a fértil se cruzó con una hembra WT (Fig. 9B). Una vez que su progenie alcanzó el estadio NF50, los animales se seleccionaron según expresaban o no la proteína fluorescente verde en sus ojos (Fig. 9C) lo cual era indicativo de que el animal era portador del transgen.

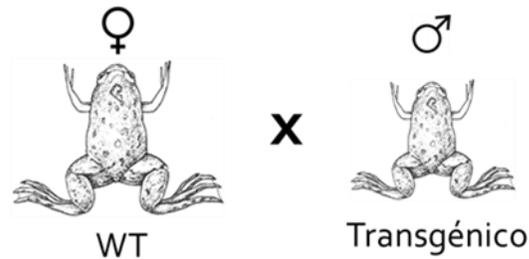
Lo primero que realizamos fue someter a los animales a un solo HS por 30 min en un recipiente con solución Barth 0,1X (Fig. 10A). A los 2, 6 y 10 días posterior al HS (dpHS), se aislaron las médulas y se procesaron para extraer RNA y/o realizar RT-qPCR.

Para este experimento se realizaron dos grupos controles de animales. El primer grupo eran animales negativos para Lin28a con HS (Lin28a(-) c/HS), mientras que el segundo grupo eran animales positivos para Lin28a sin HS (Lin28a(+) s/HS).

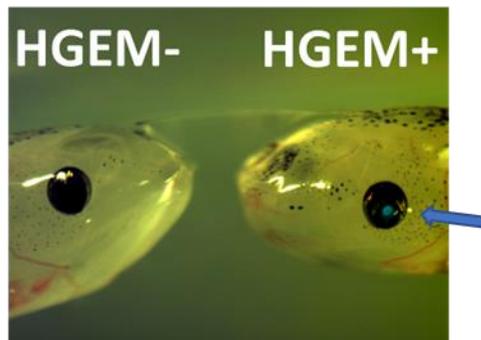
A



B



C

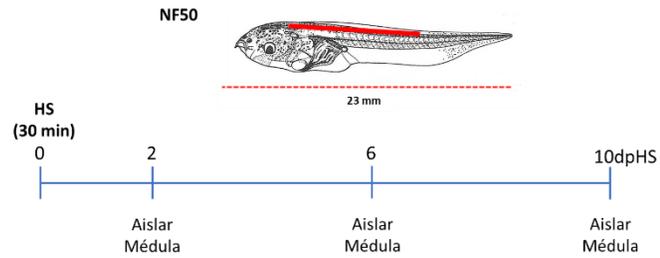


**Figura 9: Animales transgénicos para Lin28a:** Esquema del vector utilizado para realizar la transgénesis y obtener F0 Lin28a (A). Machos transgénicos F0 sexualmente maduros se cruzaron con hembras silvestres (B). La descendencia F1, fue separada en 2 grupos de animales; aquellos que son positivos para el transgen tienen ojos verdes por la expresión de la proteína fluorescente verde en el caso de los Lin28a, de aquellos negativos que tienen ojos negros (C). La expresión de Lin28a se encuentra comandada por el promotor de la proteína Hsp70b que nos permite inducir la sobre expresión de la proteína blanco a través de golpes de calor (HS). La línea transgénica utilizada Lin28a (F0), fue desarrollada en el laboratorio por el Dr. Fernando Faunes (Faunes et al., 2017).

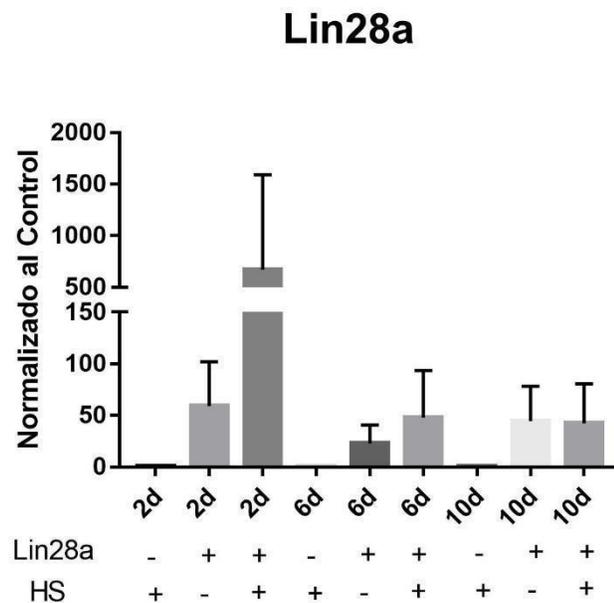
Los resultados mostraron que los animales Lin28a(+) que recibieron un HS aumentaron más de 10 veces los niveles del mRNA de Lin28a en la médula espinal a los 2dpHS, aumento que disminuyó a los 6dpHS comparado con sus respectivos controles (Fig. 10B). A los 10 días del experimento, los niveles de Lin28a en los transgénicos Lin28a(+) HS se normalizaron y llegaron a los mismos niveles de los animales Lin28a(+) s/HS. Aun así, ambos grupos de animales tuvieron niveles superiores del mRNA de Lin28a a los detectados en los animales controles Lin28a(-) HS (Fig. 10B). Es importante destacar que los animales controles Lin28a(+) s/HS, presentaron basalmente una elevada expresión en los niveles del mRNA de Lin28a al compararlo con los animales controles Lin28a(-) c/HS (Fig. 10B) en todos los días de experimentación (2, 6 y 10dpHS) correspondiente al efecto “*leaky*” que tienen este transgénico.

Siguiendo con la detección proteica de Lin28a, animales NF50 fueron sometidos a un solo HS por 30 min en un recipiente con solución Barth 0,1X. A los 2, 6 y 10 dpHS, se aislaron las médulas y se procesaron para obtener y medir los niveles proteicos de la proteína de unión a RNA (Fig. 11A). Observamos que, en los animales Lin28a(+) HS, presentaron un aumento de los niveles proteicos de Lin28a a los 2, 4 y 10 dpHS al compararlos con sus respectivos controles, siendo a los 2 días donde en mayor proporción se encontraba la proteína. Posterior a los 2 días, los niveles de la proteína fueron disminuyendo.

A



B



**Figura 10: Caracterización de animales transgénicos F1 para Lin28a:** Animales NF50 Lin28a fueron sometidos a un HS a 35°C por 30 minutos, para inducir la sobre expresión de Lin28a. Protocolo utilizado para inducir la sobre expresión de Lin28a y los días en los cuales se extrajo la médula espinal, la línea roja marca la zona aislada de la médula utilizada para realizar la medición por RT-qPCR de Lin28a (A). RT-qPCR que muestra la sobre expresión del mensajero de Lin28a en la médula espinal de *X. laevis* NF50 (B). Se observa que existe un aumento basal de Lin28a en los transgénicos sin HS. Al someter los animales a un HS, visualizamos un aumento considerable de la expresión del mensajero el cual se mantiene alto hasta los 6 dpHS al comparar con su control, llegando a valores normales a los 10 días. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los días del tratamiento. El gen de referencia utilizado en cada caso corresponde al *EEF1α1*. Se realizó un t-students para el análisis estadístico con un n=3 de réplicas biológicas. No existen diferencias significativas.

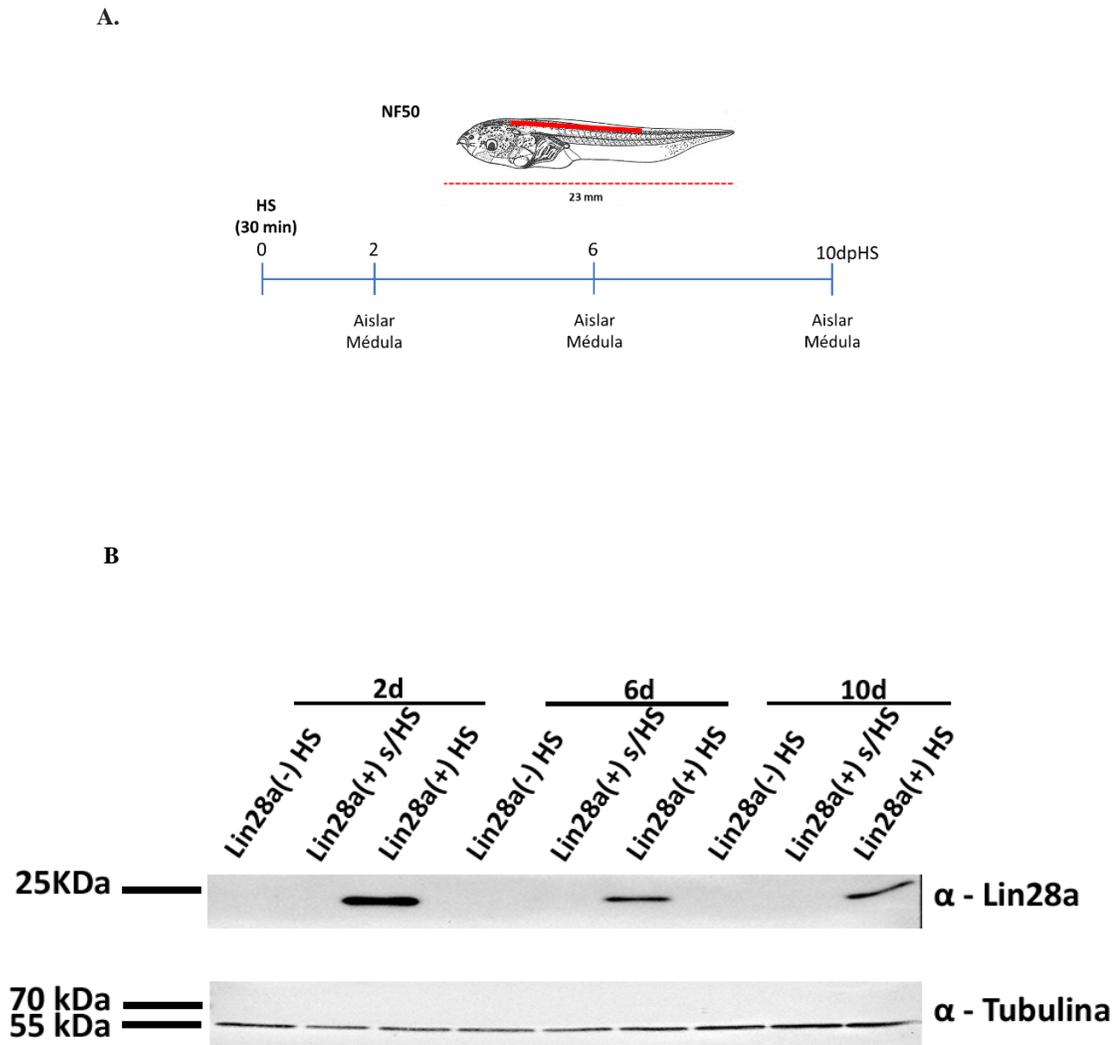
Sin embargo, aún eran detectables a los 10 dpHS, mientras que en los controles no es posible detectar la proteína endógena (Fig. 11B). En esta ocasión y a diferencia de lo visto con el mensajero de Lin28a, tanto en los animales control Lin28a(+) s/HS como en los Lin28a(-) c/HS, no se detectaron niveles basales de la proteína. Esto sucedió en todos los días de experimentación en el cual se aislaron las médulas espinales (Fig. 11A y 11B).

### **3. Sobre expresión de Lin28a**

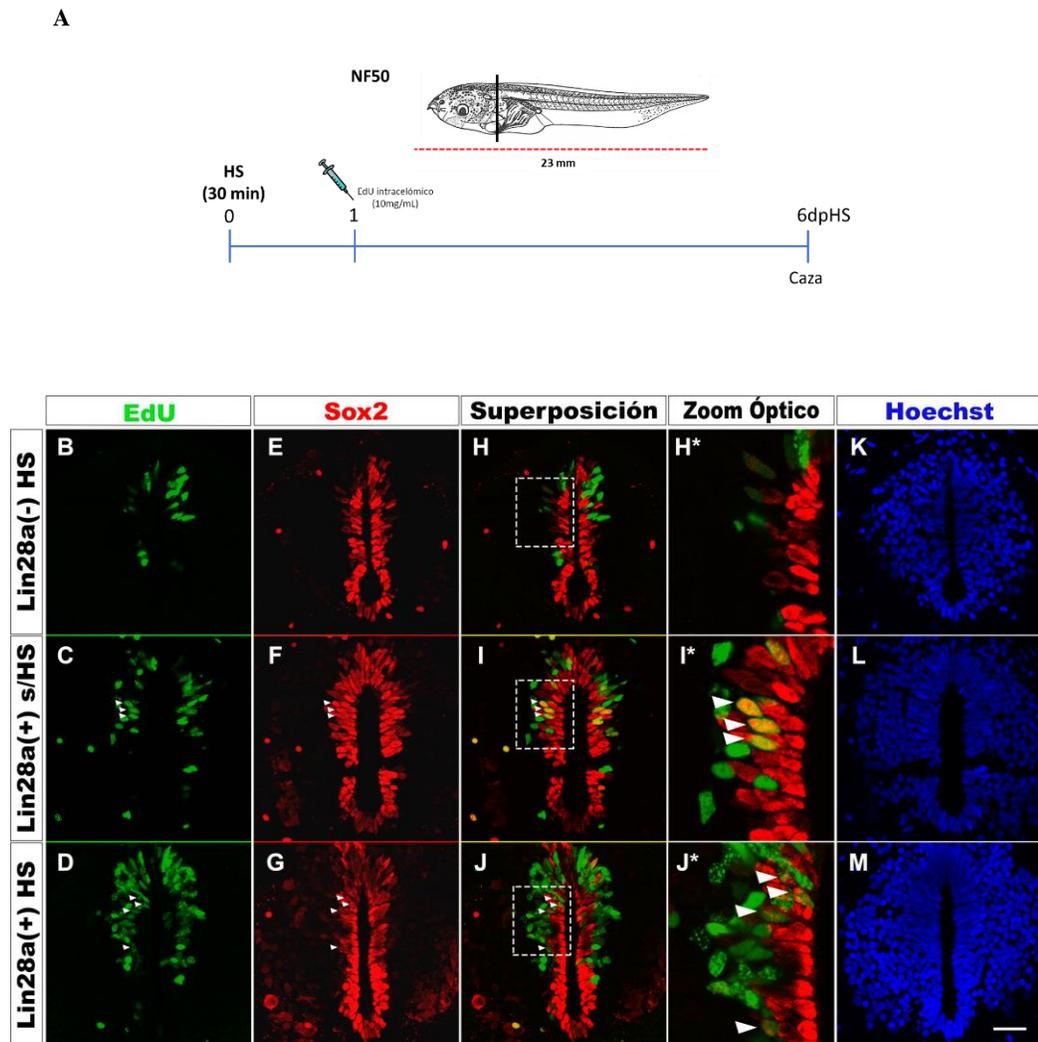
#### **3.1. Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la proliferación de progenitores neurales Sox2+.**

Existe evidencia científica en *C. elegans* y en modelos murinos que la disminución o sobre expresión de Lin28a afecta la proliferación de las células madre neurales (NSC) y progenitores neurales (NPC) en el SNC (Herrlinger et al., 2019; E G Moss et al., 1997; Robinton et al., 2019), por esta razón quisimos determinar la función de Lin28a en la neurogénesis de la médula espinal en *X. laevis*.

Para esto, en condiciones de ausencia de daño y sobre expresión de Lin28a, animales Lin28a(+) y Lin28a(-) fueron sometidos a un HS por 30 min, para inducir la sobre expresión de Lin28a. Venticuatro horas después, fueron inyectados con EdU intraceloma (Fig. 12A). Seis días posterior al HS se aisló la médula y se analizó el efecto en la proliferación celular en la médula espinal (Fig.12B-M).



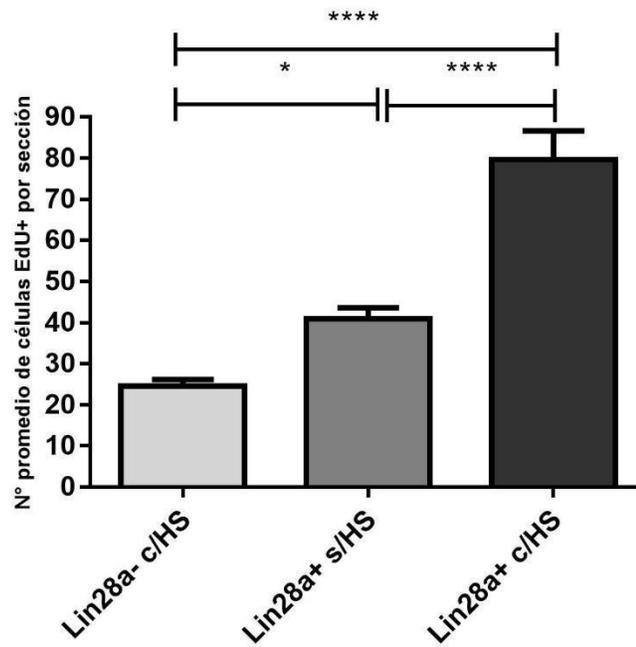
**Figura 11: Lin28a se mantiene estable hasta los 10 días posteriores a la sobre expresión en animales transgénicos:** Animales NF50 Lin28a fueron sometidos a HS a 35°C por 30 minutos, para inducir la sobre expresión de Lin28a. Protocolo utilizado para inducir la sobre expresión de Lin28a y los días en los cuales se extrajo la médula espinal, la línea roja marca la zona aislada de la médula utilizada para analizar los niveles proteicos de Lin28a (A). Western blot contra Lin28a utilizando como proteína de referencia a alfa tubulina (B). Se observa que existe un aumento de la proteína Lin28a a los 2, 6 y 10 dpHS, manteniéndose estable durante todo el periodo analizado con un n=2 de réplicas biológicas.



**Figura 12: Sobre expresión de Lin28a produce aumento de la proliferación celular en la médula espinal de animales transgénicos Lin28a.** Protocolo utilizado para inducir la sobre expresión de Lin28a en animales transgénicos lin28a NF50, la línea negra marca la zona que se visualiza en B-M (A). Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la proliferación celular de la médula espinal a los 6 dpHS (B-D). Se observa un aumento basal de células Edu+ en animales control Lin28a(+) s/HS al compararlos con el control consanguíneo Lin28a(-) HS, mientras, que a los animales Lin28a(+) HS, tiene un marcado aumento, producto de la sobre expresión de Lin28a. Inmunofluorescencia contra Sox2, marcador de progenitor neural en la médula (E-G). Superposición de la marca Edu+ con la marca Sox2+ (H-J) y zoom óptico de la zona marcada (H\*-J\*). Marca nuclear Hoechst (K-M). Barra de escala 50  $\mu$ m. Este experimento corresponde a n=3 de réplicas biológicas.

En animales Lin28a(-) HS, se observó una proliferación basal en la zona endimaria concentrada en la parte dorsal de la médula espinal (Fig. 12B, E, H, H\*) en un promedio aproximado de 22 células (Fig. 13). En los animales Lin28a(+) s/HS se observó un aumento significativo de casi el doble de células que estaban proliferando en la médula espinal al compararlo con el control (Fig. 12C, F, I, I\* y Fig. 13). A pesar de que en los animales Lin28a(+) s/HS existe un aumento de la proliferación, al igual que el caso anterior, la proliferación se encontraría centrada preferentemente en la zona dorsal de la médula de *X.laevis* (Fig. 12I y I\*). De igual forma, en ambos casos la proliferación está en su mayoría acotada a la zona endimaria (Fig. 12H, H\*, I y I\*).

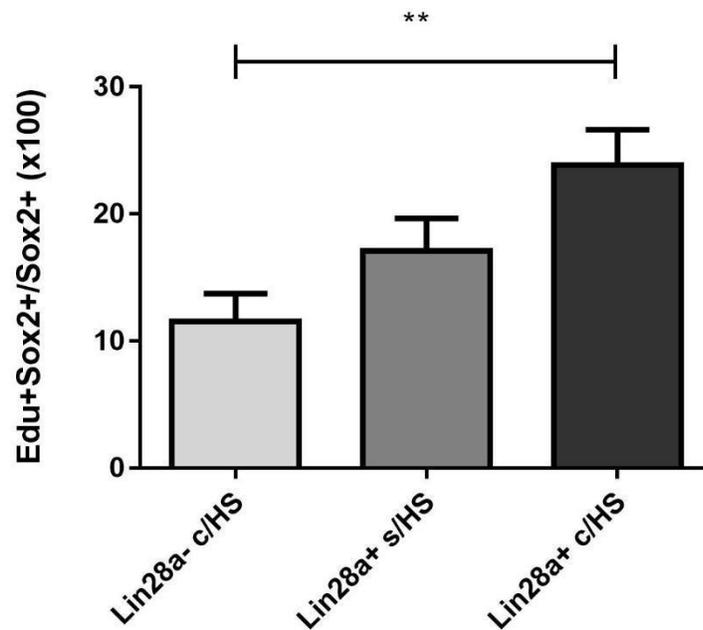
En forma importante, observamos que la tasa de proliferación se elevó en los animales positivos para Lin28a sometidos a HS para sobre expresar el transgén Lin28a (Fig. 13). Estos animales Lin28a(+) HS presentaron un aumento significativo de los niveles de proliferación celular al compararlo con sus controles (Fig 12D, G, J, J\* y Fig. 13) concentrada en la zona dorsal al igual que en los controles, pero a diferencia de ellos, se observó un mayor número de células proliferando en la zona medio lateral de la médula espinal (Fig. 12J, J\* y Fig. 13). Estas células en proliferación, llamativamente, se encontraron en la zona endimaria, pero algo alejadas del canal central, a diferencia de sus controles (Fig. 12J-J\*). Por último, observamos que habían muy pocas células en proliferación en la parte más ventral de la médula espinal de los animales Lin28a(-) y (+) NF50 (Fig. 12B-D y 13H-J).



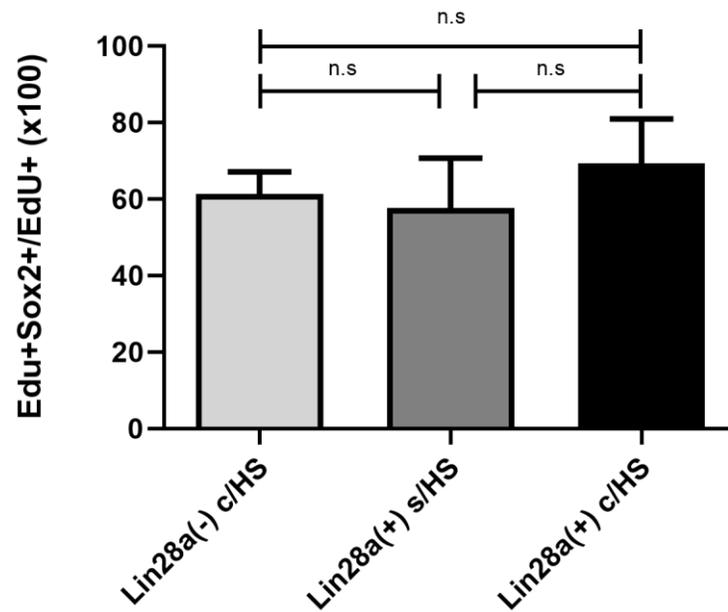
**Figura 13: Aumento de la proliferación celular en respuesta a la sobre expresión de Lin28a en la médula espinal de animales Lin28a.** Cuantificación del número de células EdU+ por sección en la inmunofluorescencia de la figura 12. Esta cuantificación se realizó en criosecciones histológicas de 10  $\mu\text{m}$  de médula espinal de *X. laevis* Lin28a NF50, a los 6 dpHS e inyectado con EdU 24 horas después del HS. Al inducir la sobre expresión de Lin28a en animales Lin28a(+) HS, observamos que el número de células que proliferan aumenta significativamente con respecto a sus controles. En los animales Lin28a(+) s/HS, se presenta una proliferación basal significativa al compararla con el control Lin28a(-) HS. El análisis estadístico realizado corresponde a Anova de una vía. \* $P < 0,018$  y \*\*\*\* $P < 0.0001$  con  $n=3$  de réplicas biológicas.

Analizamos si las células Sox2+ eran las células en proliferación en la médula espinal, ya que, se vio ser esenciales para la regeneración de la médula espinal en *X. laevis* (Muñoz et al., 2015). En animales NF50 Lin28a(-) HS, las células Sox2+ presentaron una proliferación basal en la médula espinal de un 10% (Fig. 12H-H\* y Fig. 14), mientras que los animales Lin28a(+) s/HS presentaron un leve aumento no significativo de alrededor de un 15% del total de células Sox2+ (Fig. 12I-I\* y Fig. 14). Sin embargo, y en forma importante, en los animales Lin28a(+) HS el porcentaje promedio de células Sox2+ que se encontraban en proliferación a los 6dpHS o 5 días posteriores a la inyección de EdU intracelómico fueron el doble (Fig. 12J-J\* y Fig. 14) en comparación a los animales Lin28a(-) s/HS (Fig. 12H-H\* y Fig. 14). Este aumento fue significativo sólo al compararlo con el control de animales Lin28a(-) HS, mientras que no se encontró diferencias significativas con los animales Lin28a(+) s/HS (Fig. 14). Esto demuestra que la sobre expresión de Lin28a genera un aumento de los niveles de proliferación de las células Sox2+.

Posterior a determinar el aumento del porcentaje de las células Sox2+ que estaban proliferando en la médula espinal, quisimos investigar si había cambios en el tipo celular que estaba proliferando en la médula espinal producto de la sobre expresión de Lin28a. Por esta razón, se cuantificó el porcentaje de células que eran doblemente positivas para Sox2/EdU del total de células EdU+ encontradas en la médula espinal. Los resultados mostraron que no existía aumento del porcentaje de células Sox2+ que estaban proliferando en la condición de sobre expresión de Lin28a, al compararlos con sus respectivos controles (Fig. 15).



**Figura 14: Aumento de la proliferación de progenitores neurales en respuesta a la sobre expresión de Lin28a en la médula espinal de animales transgénicos.** Cuantificación número de células EdU+/Sox2+ por sección de la Inmunofluorescencia de la figura 12. Esta cuantificación se realizó en criosecciones histológicas de 10  $\mu$ m de médula espinal, a los 6 dpHS e inyectado con EdU 24 horas después del HS. Existe un aumento significativo del número de células EdU+/Sox2+, en los animales Lin28a(+) HS, al compararlo con el control Lin28a(-) HS. El análisis estadístico realizado, corresponde a Anova de una vía. \*\*P < 0,0028 con n=3 de réplicas biológicas

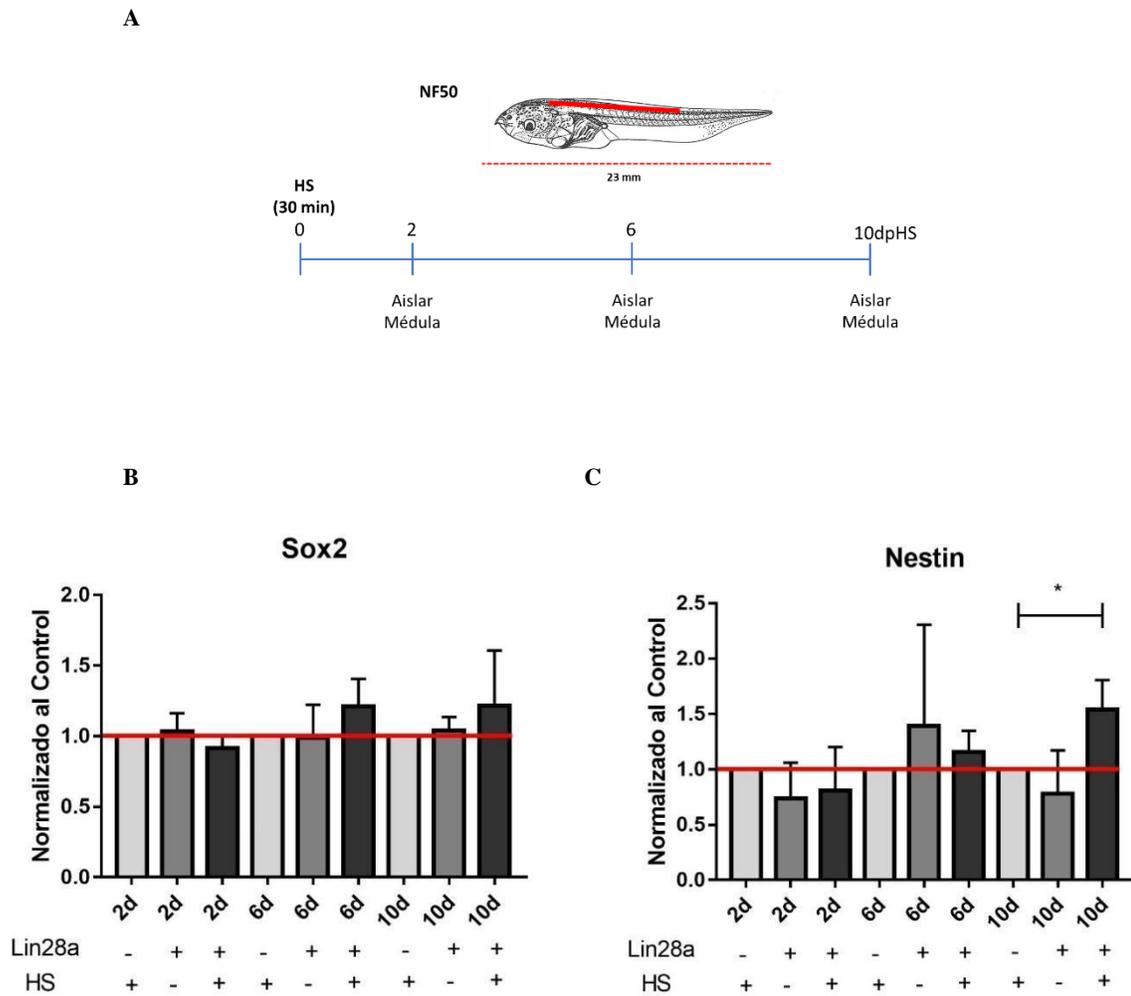


**Figura 15: Proliferación de progenitores neurales Sox2 del total de células en proliferación en respuesta a la sobre expresión de Lin28a en la médula espinal de animales transgénicos.** Cuantificación número de células EdU+/Sox2+ del universo de células EdU+ por sección de la Inmunofluorescencia de la figura 12. Esta cuantificación se realizó en criosecciones histológicas de 10  $\mu$ m de médula espinal, a los 6 dpHS e inyectado con EdU 24 horas después del HS. No existen diferencias significativas de la proporción de células que están proliferando y son Sox2+. El análisis estadístico realizado, corresponde a Anova de una vía con n=3 de réplicas biológicas

### **3.2. Efecto de la sobre expresión de Lin28a sobre marcadores de progenitores neurales.**

Los experimentos realizados nos permitieron indicar que, a nivel celular, existía un aumento de la tasa de proliferación en la médula espinal producto del aumento de Lin28a en los animales transgénicos. Sin embargo, requeríamos determinar el efecto a nivel molecular y detectar si se presentaban cambios en los niveles de mensajeros de diferentes genes claves para la proliferación celular.

Realizamos un HS al día cero y aislamos médula a los 2, 6 y 10dpHS (Fig. 16A), luego se procedió a cuantificar los cambios en los niveles del mensajero de Sox2 y Nestin, ambos genes marcadores de progenitores celulares. Para Sox2, se observó una tendencia al aumento de los niveles del mensajero en los animales Lin28a(+) HS a los 6 y 10dpHS comparado con sus controles. Sin embargo, en ninguno de los casos observamos se observó una diferencia significativa (Fig. 16B). Contrario fue lo observado para Nestin en el cuál detectamos un aumento significativo de los niveles del mensajero de este gen, en los animales Lin28a(+) HS a los 10dpHS comparándolos con el control Lin28a(-) HS. Esto indicaría, que la sobre expresión de Lin28a provocó un aumento tardío en los niveles de RNAm de Nestin.



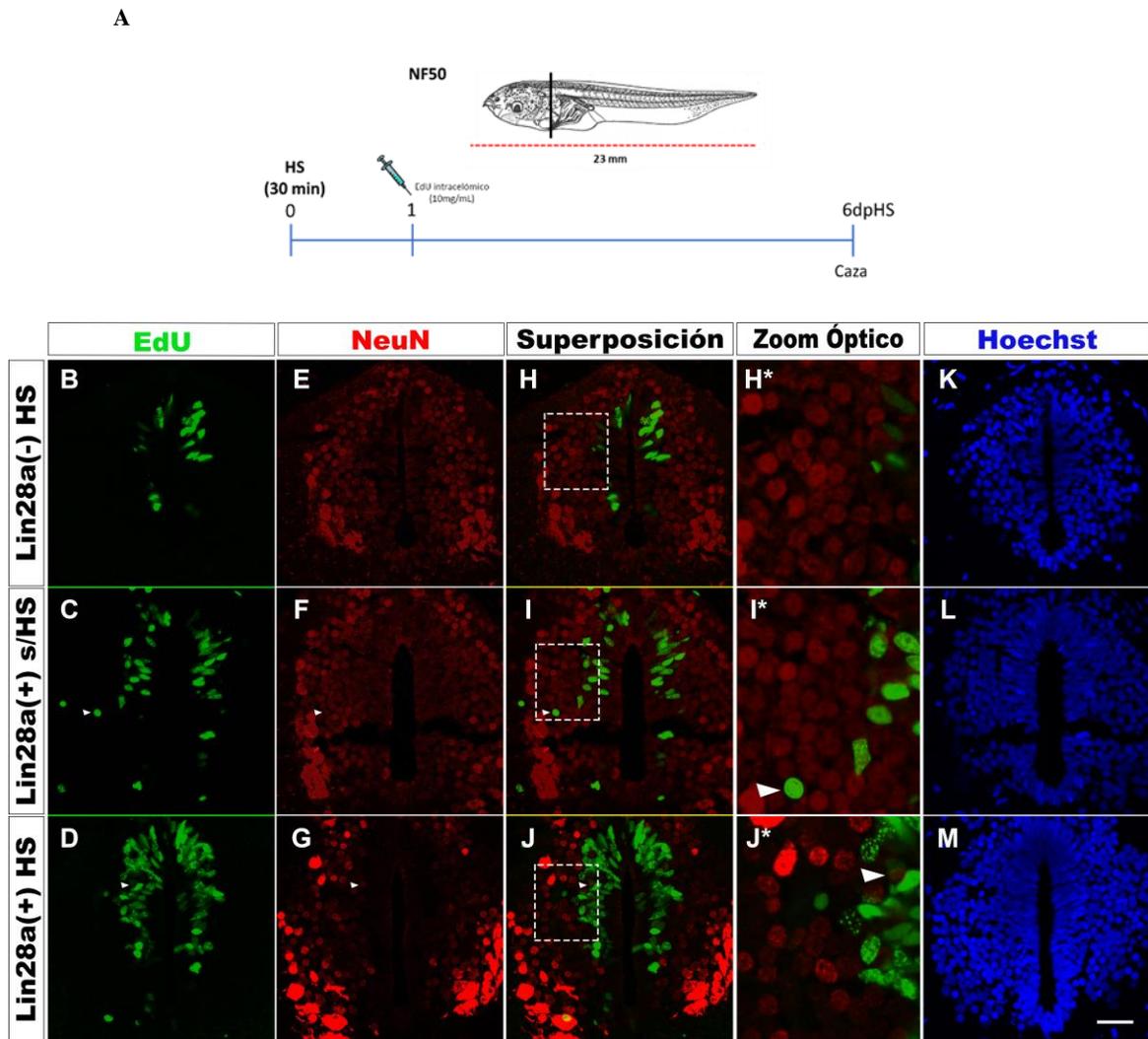
**Figura 16: Aumento de Nestin en respuesta a la sobre expresión de Lin28a.** Animales Lin28a fueron sometidos a HS a 35°C por 30 minutos, para inducir la sobre expresión de Lin28a. A, protocolo utilizado para inducir la sobre expresión de Lin28a y los días en los cuales se aisló la médula (línea roja marca la zona aislada) para realizar RT-qPCR de marcadores de progenitores como Sox2 y Nestin. B, RT-qPCR de los niveles expresión de Sox2 en la médula espinal, se observa un leve aumento a los 6 y 10 dpHS en los animales Lin28a(+) HS, sin embargo, no es significativo al compararlo con sus controles. C, RT-qPCR de la expresión de Nestin, se observa un aumento de los niveles de este marcador a los 10 dpHS en los animales Lin28a(+) HS, al compararlo con el control Lin28a(-) HS. El gen de referencia utilizado en cada caso corresponde al *EEF1α1*. Se realizó un t-student con un  $p < 0,0247$  con  $n=3$  de réplicas biológicas.

### 3.3. Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la neurogénesis

Una vez determinando que la sobre expresión de Lin28a afecta la proliferación celular y la expresión de genes relacionados con un fenotipo de células pluripotentes. Nos preguntamos si Lin28a afectaría, de alguna manera, el proceso de neurogénesis. Para esto, animales transgénicos Lin28a fueron sometidos a un HS al día cero e inyectados con EdU al día siguiente, a los 6dpHS se aisló la médula para procesarlas según se requería (Fig. 17A).

Como ya hemos evidenciado, existe una proliferación basal en los animales WT (Fig. 3N). En este experimento dentro de los animales controles utilizados, se encuentran los Lin28a(-) HS, que al igual que los WT, exhiben una tasa de proliferación similar por incorporación de EdU (Fig. 17B y Fig. 18). Sin embargo, al cuantificar cuántas de estas nuevas células llegaron a ser neuronas (Fig. 17E, H, H\*) menos de un 2% de las células que estaban proliferando al momento de la inyección de EdU, llegaron a ser neurona a los 6dpHS (Fig. 18).

Cuando comparamos a los animales Lin28a(-) HS con los animales Lin28a(+) s/HS, encontramos un incremento de la marca de EdU en la médula espinal de estos animales en ausencia total de una sobre expresión inducida de Lin28a (Fig. 17C). Este aumento de la señal de EdU, es acompañada por un aumento de células doblemente marcadas EdU+/NeuN+ (Fig. 17F, I y I\*) detectadas en la médula espinal, al compararlo con los animales Lin28a(-) c/HS (Fig. 18). Al cuantificar, ese aumento, observamos que el porcentaje llega a ser un poco más del doble (sobre un 2%) que el observado en el otro control Lin28a(-) (Fig. 18). Sin embargo, no fue significativo ese aumento que se veía. En forma importante, cuando comparamos los



**Figura 17: Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la neurogénesis de la médula espinal.** Protocolo utilizado para inducir la sobre expresión de Lin28a en animales transgénicos lin28a NF50, la línea negra, marca la zona aproximada que se visualiza en B-M. Eefecto de la sobre expresión de Lin28a sobre la proliferación celular en la médula espinal de *X. laevis* a los 6dpHS, se observa un marcado aumento de Edu en los animales Lin28a(+) que fueron sometidos a HS (B-D). Por otro lado, se presenta un aumento basal de Edu+ en animales control Lin28a(+) s/HS al compararlos con el control de Lin28a(-) HS. Inmunofluorescencia contra NeuN marcador de neuronas maduras, muestra una zona cercana a moto neuronas (E-G). Superposición de la marca Edu+ con la marca NeuN+ (H-J) y zoom óptico de la zona marcada (H\*-J\*) en donde observamos nuevas neuronas a través de la doble marca de EdU/NeuN. Marca nuclear Hoechst (J-L). Barra de escala 50  $\mu$ m.

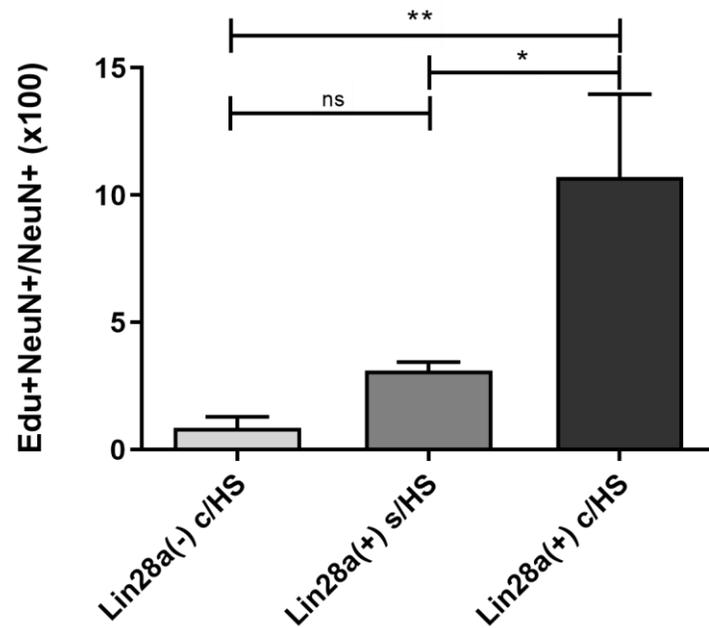
controles anteriores con el grupo Lin28a (+) HS, a los cuales se les indujo la sobre expresión de Lin28a, detectamos un aumento considerablemente de la marca de EdU (Fig. 17D) y de la doble marca para EdU+/NeuN+ (Fig. 17G, J, J\* y Fig. 18). En este caso, el porcentaje del número de células doblemente positivas para ambos marcadores superó al 10% del total de células NeuN positivas totales detectadas en la médula espinal de los animales Lin28a(+) HS, siendo un aumento significativo al comparar con los respectivos controles (Fig. 18).

En paralelo a la determinación del efecto de Lin28a sobre la neurogénesis a través de inmunofluorescencia, quisimos confirmar los resultados midiendo los niveles de mensajeros de genes marcadores del proceso de neurogénesis como *Ascl1*, *DCX*, *NeuroD1*, *NRG 2* y *NRG 3*, utilizando RT-qPCR.

Con este propósito, animales Lin28a(+) fueron sometidos al día 0 a un HS utilizando como controles a los animales Lin28a(-) HS y animales Lin28a(+) s/HS. A los 2, 6 y 10dpHS de experimentación se les aisló la médula para extraer RNAm (Fig. 19A).

Cuando analizamos los niveles de expresión del mensajero de *Ascl1*, no se observaron diferencias significativas en los distintos días de experimentación de los grupos estudiados, en ningún momento (Fig. 19B).

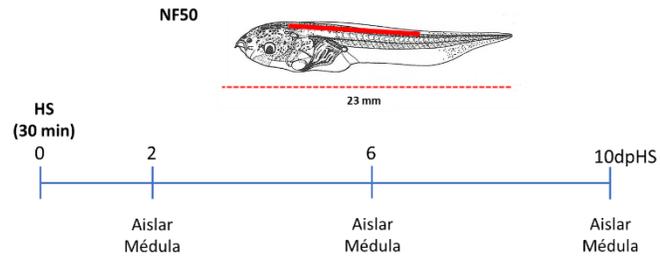
Para el caso de marcado de neuroblastos *DCX*, a los 2dpHS se vio muy pareja la expresión entre los diferentes tipos de animales, pero a los 6dpHS y 10dpHS detectamos un incremento del marcador cuando comparábamos a los animales Lin28a(-) HS con los animales Lin28a(+) HS debido a que se observaba un aumento de *DCX*, sin embargo, la diferencia



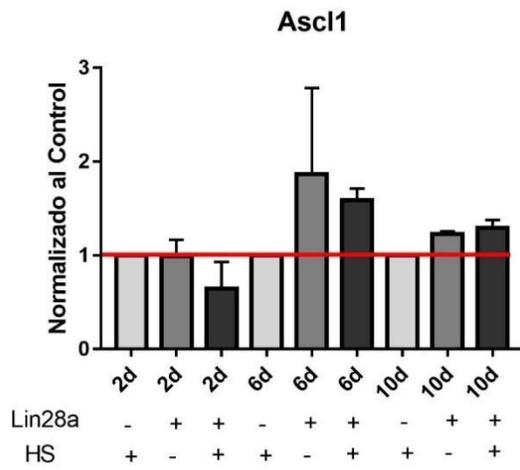
**Figura 18: Efecto de la sobre expresión de Lin28a en la neurogénesis.** Porcentaje de células Edu+/NeuN+ por sección de la Inmunofluorescencia presentada en la figura 17. Se observa un aumento significativo del número de células EdU+/NeuN+ en los animales Lin28a(+) HS, al comparar con sus controles. El análisis estadístico realizado, corresponde a Anova de una vía. \*P < 0,032 y \*\*P<0.006 con n=3 de réplicas biológicas

**Figura 19: Sobre expresión de Lin28a produce aumento de genes marcadores de neuroblastos a tiempos tardíos.** Protocolo utilizado para inducir la sobre expresión de Lin28a y los días en los cuales se realizó la obtención de la médula espinal para el análisis de los niveles de mensajeros (A). RT-qPCR de los niveles de *Ascl1*, se aprecia que existe una tendencia al aumento de los niveles del marcador a los 6 y 10 dpHS en los animales Lin28a(+) HS, sin embargo, al ser solo n=2 de réplicas biológicas no se puede aplicar estadística (B). RT-qPCR de los niveles de *DCX*, observamos un aumento significativo a los 6 dpHS que pareciera mantenerse a los 10 dpHS sin ser estadísticamente significativo, al comparar en ambos casos a la condición Lin28a(+) HS, con el control Lin28a(-) HS (C). RT-qPCR de *NeuroD1*, podemos observar una tendencia al aumento en todos los días del tratamiento, sin ser significativo en ninguno al comparar Lin28a(+) HS con los controles (D). Se ve una disminución significativa de la expresión del *NRG2*, a los 2 dpHS comparando Lin28a(+) HS y Lin28a(+) s/HS, con el control Lin28a(-) HS (E). A pesar de que existe tendencia al aumento a los 6 y 10 dpHS, solo es significativo el aumento a los 10 dpHS, al compararlo con ambos controles. Finalmente, se muestra el RT-qPCR de los niveles de expresión de *NRG3* (F). Podemos observar una tendencia al aumento a los 6 y 10 dpHS sin ser significativa, y una disminución significativa a los 2 dpHS. El gen de referencia utilizado en cada caso corresponde al *EEF1 $\alpha$ 1*. La prueba estadística utilizada en cada caso fue un t-students con  $p < 0,025$ . Todos los experimentos contienen n=3 excepto *Ascl1* con n=2.

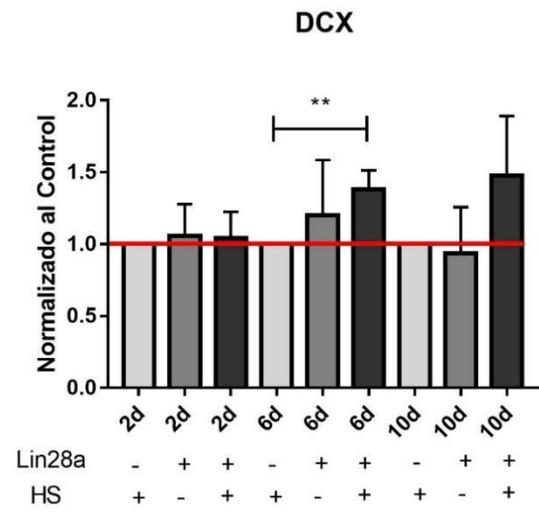
A

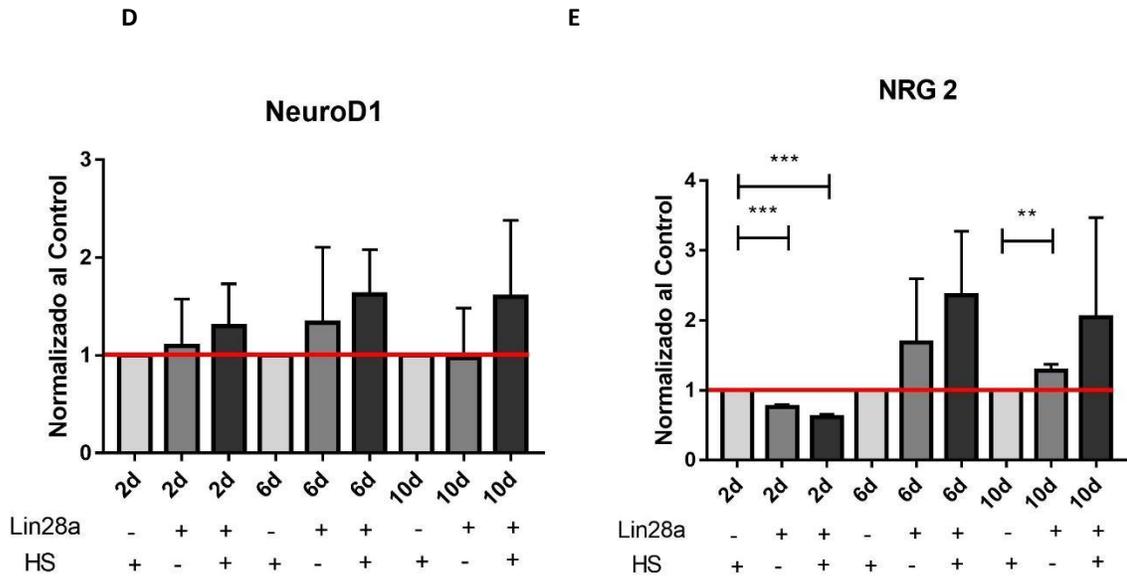


B

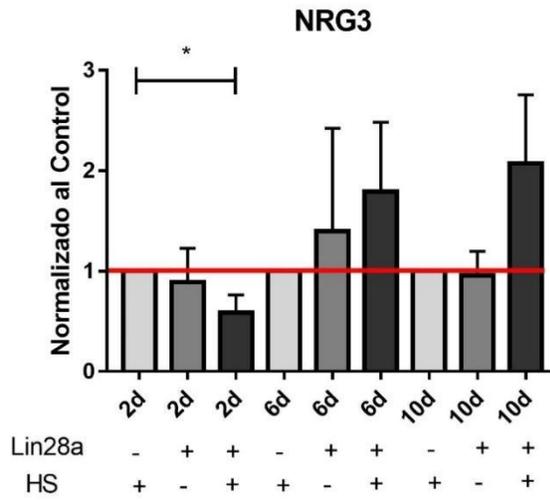


C





**F**



encontrada sólo fue significativa a los 6 dpHS, aunque en 10 dpHS fue también posible ver una tendencia al aumento (Fig. 19C).

Se observó lo contrario al analizar la expresión de NeuroD1, ya que, a pesar de que se ve que existe una tendencia al incremento de los niveles del marcador en cada uno de los días analizados al comparar los animales Lin28a(-) HS, Lin28a(+) s/HS con los animales Lin28a(+) HS, en ningún caso se detectó que estas diferencias fueran significativas entre días y/o tratamientos en los grupos de experimentación (Fig. 19D).

Particularmente, en el caso del marcador de neurogénesis NRG 2, observamos que a los 2dpHS existía una disminución de los niveles del mensajero de este gen tanto en los animales Lin28a(+) HS como en los animales que no fueron sometidos a un HS (Fig. 19E). A los 6 y 10dpHS de tratamiento, se evidenció un aumento de los niveles en ambos grupos de animales al compararlos con los controles Lin28a(-) HS. Sin embargo, solo fue posible detectar un cambio significativo en los animales Lin28a(+) s/HS a los 10 dpHS comparados con el control Lin28a(-) HS (Fig. 19E).

Efecto similar al descrito con NRG 2 ocurrió con NRG 3. En el primer día de análisis, 2dpHS, se observó que los animales transgénicos positivos exhibieron una disminución en los niveles del marcador al ser comparados con los niveles del grupo control de animales Lin28a(-) HS. Esta disminución fue significativa en el caso de los animales Lin28a(+) HS teniendo como referencia a los animales Lin28a(-) HS. En los días posteriores, se observó una tendencia al aumento o recuperación de los niveles del gen a los 6 y 10 dpHS pero que no llegó a ser significativo en ningún caso (Fig. 19F).

### 3.4. Efecto de la sobre expresión de Lin28a en estadios no regenerativos de *Xenopus laevis*.

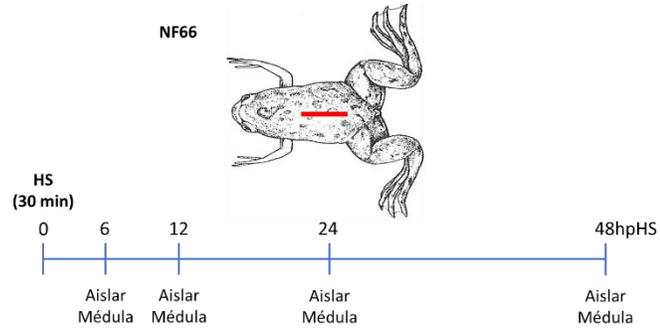
Nuestros resultados previos nos indican que hay proliferación, activación de progenitores neurales y neurogénesis en animales NF50 Lin28a (+), donde el estadio es conocido que tiene capacidad de regeneración, entonces nos preguntamos qué sucedería si sobre expresamos Lin28a (+) en un estadio que perdió la capacidad de regenerar su médula espinal después de un daño. Para respondernos esto sobre expresamos Lin28a en animales de estadios juveniles de *X. laevis*, en estadios NF66.

Como primera aproximación analizamos los niveles de expresión del mensajero de Lin28a utilizando RT-qPCR, posterior a la sobre expresión del gen a tiempos tempranos como lo son las 6, 12, 24 y 48 horas post heat shock (hpHS) en la médula espinal de NF66 (Fig. 20A). Se eligieron estos tiempos porque consideramos que de existir un efecto de Lin28a en la regeneración debería ser en donde encontrásemos la mayor cantidad de Lin28a. Como referencia, teníamos los experimentos en NF50 donde el “*peak*” de sobre expresión lo vimos a las 6 horas.

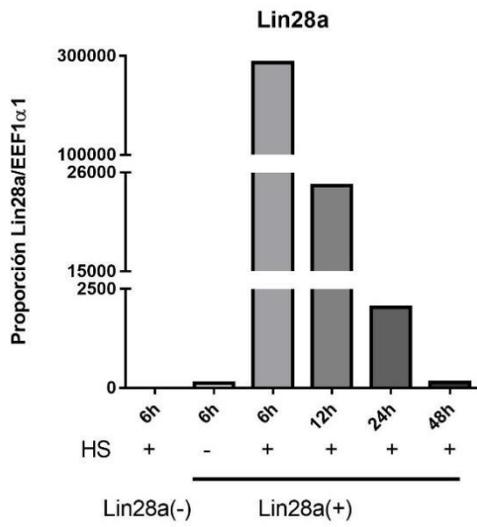
En el caso del grupo Lin28a(+) HS, el efecto del HS provocó un aumento muy considerable en los niveles detectados del mensajero de Lin28a a las 6hpHS (Fig. 20B). En el mismo tiempo, los animales Lin28a(-) c/HS presentaron niveles mínimos de Lin28a al comparar con las otras condiciones. De igual forma, los animales Lin28a(+) s/HS tienen el mismo efecto leak que se vio en los animales NF50 Lin28a(+) s/HS, es decir, encontramos una mayor

**Figura 20: Efecto de la sobre expresión de Lin28a sobre los niveles del mensajero y la proteína Sox2 a tiempo tempranos en animales no regenerativos.** Animales transgénicos para Lin28a NF66 fueron sometidos a un HS a 35 °C por 30min para inducir la sobre expresión de Lin28a. Protocolo utilizado para sobre expresar Lin28a (A). Sobre expresión de Lin28a de muestra que los transgénicos responden al HS (B) y sobre expresan Lin28a el cual podría tener un efecto sobre los niveles del mensajero de Sox2 (C) a los días 2, 4 y 8 dpHS. Niveles proteicos de Lin28a después del HS y la disminución que provoca sobre la expresión de la proteína Sox2 a tiempo tempranos de 6, 12, 24 y 48 horas después de la sobre expresión de Lin28a (D-E). El gen de referencia utilizado en los RT-qPCR corresponde al EEF1 $\alpha$ 1. Alfa tubulina, fue utilizada como proteína de referencia para los análisis de western blot. Los experimentos corresponden a un n=1 de réplicas biológicas.

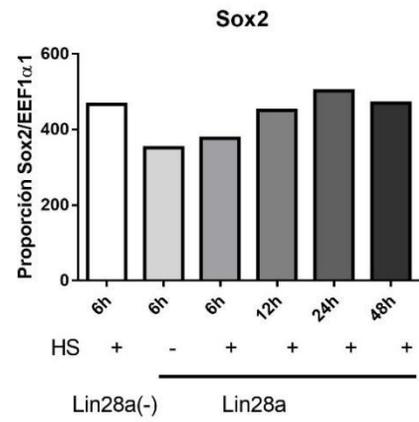
A



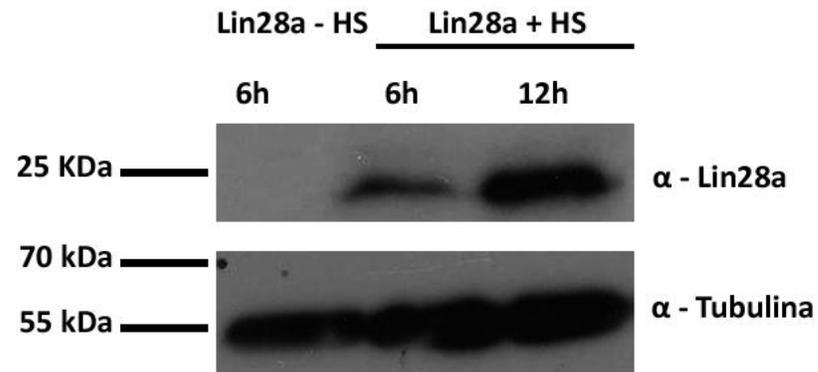
B



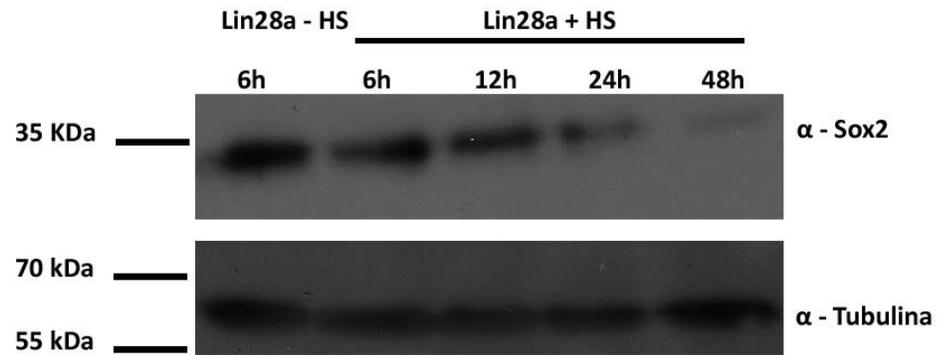
C



D



E



proporción de expresión del mRNA de Lin28a al compararlo con los grupos negativos para el transgén.

Al siguiente tiempo analizado, observamos que el efecto del HS fue disminuyendo cada vez más a medida que avanzaba el tiempo hasta que a las 48 hpHS los niveles del RNA de Lin28a del grupo Lin28a(+) HS llegaban a niveles similares a los detectados en el grupo control Lin28a(+) s/HS a las 6 hpHS (Fig. 20B).

En párelo a la medición de Lin28a, determinamos si la sobre expresión de Lin28a tenía algún efecto en genes claves involucrados en la regeneración de la médula espinal de *X. laevis*. Por esta razón, cuantificamos los niveles del mensajero del gen Sox2 en las mismas condiciones utilizadas para medir Lin28a (Fig. 20C). A los 6dpH pareciera haber menos Sox2 en los animales Lin28a(+) HS y Lin28a(+) s/HS al compararlo con los animales Lin28a(-) HS. Esta disminución observada en los niveles de Sox2 pareciera ser recuperada, a medida que transcurre el tiempo post HS, llegando a los mismos niveles percibidos en los animales Lin28a(-) en las 6 horas de sobre expresión (Fig. 20C). Un mayor “n” es necesario para concluir.

A nivel proteico, en los animales NF66 Lin28a(-) c/HS, no detectamos la proteína endógena de Lin28a a las 6hpHS, sin embargo, en los animales Lin28a(+) c/HS observamos un aumento de los niveles de la proteína Lin28a al compararlo con el control en el mismo tiempo experimental. A las 12hpHS, los niveles proteicos de Lin28a, siguen en aumento siendo mucho mayores que los encontrados a las 6hpHS de experimentación (Fig. 20D).

Cuando analizamos los niveles de la proteína Sox2 pudimos evidenciar altos niveles basales de Sox2 en los animales NF66 Lin28a (-) a las 6hpHS. Estos niveles fueron similares a

los observados en los animales Lin28a(+) c/HS, pero a medida que avanzaban las horas posteriores a la sobre expresión de Lin28 encontramos, de forma importante, que los niveles proteicos de Sox2 iban disminuyendo al punto que, a las 48hpHS, los niveles fueron extremadamente bajos (Fig. 20E).

Estos resultados nos sugieren que al menos a nivel proteico, la sobre expresión de Lin28a podría estar provocando una caída de la expresión de Sox2.

## DISCUSIÓN

Uno de los grandes desafíos que existen en el campo de la regeneración, es entender y encontrar la forma de contrarrestar el efecto que genera un daño a la médula espinal en humanos. Daño que es considerado irreversible y que, dependiendo de la complejidad, es generador de un cuadro de parálisis parcial o total en las personas.

El foco de esta tesis se centra en dos ejes. El primer eje es evidenciar neurogénesis en respuesta al daño considerando que es uno de los mecanismos disponibles de *X. laevis* para regenerar la médula espinal (Muñoz et al., 2015), mientras que el segundo eje es entender el efecto que tendría la proteína de unión a RNA Lin28 sobre la proliferación y neurogénesis a través de la modulación de los progenitores neurales Sox2+.

## **1. Proliferación Celular y Progenitores de la Médula Espinal de *Xenopus laevis***

Dentro de las preguntas que tenemos en nuestro laboratorio, con respecto al estudio de la regeneración de la médula espinal, es determinar si efectivamente uno de los mecanismos involucrados en la regeneración de la médula espinal en estadios regenerativos es la neurogénesis.

En la primera parte de nuestro trabajo nos enfocamos en realizar estudios de pulso y caza utilizando el marcador de proliferación celular EdU con inyecciones intracelómicas controladas, para establecer el método de estudio que nos permitiría trazar el origen de una nueva neurona y diferenciarla de una existente.

Realizando una inyección de EdU al día cero y la caza a los 2, 4 y 10dpt (Fig. 4A). Vimos que, al igual que en experimentos previos de nuestro laboratorio utilizando BrdU (Muñoz et al., 2015), aumentaba la proliferación celular en la médula espinal producto del daño (Fig. 4B, F, J, N, Q, U). Este aumento se detectó hasta los 10dpt sin evidenciar una caída significativa entre los días de tratamiento en los diferentes grupos de animales transectados (Fig. 4B y Fig. 5).

Este aumento sostenible en el tiempo llamó nuestra atención, ya que, en los estudios previos de nuestro grupo donde se utilizó BrdU para ver proliferación, se encontró que la proliferación era transiente y principalmente era detectada a los 2dpt mientras que a tiempos posteriores a los 6dpt, la marca de BrdU caía considerablemente (Muñoz et al., 2015).

Basado en los protocolos de trabajo con BrdU y EdU, y la facilidad que presentan ambos análogos de timidina de incorporarse a las hebras de DNA, las potenciales ventajas que presenta EdU son: la no utilización de un agente denaturante como tratamiento para la detección del análogo que, a diferencia del BrdU que utiliza HCl provocando la ruptura de las hebras de DNA y consiguiente pérdida de las moléculas de BrdU incorporadas en el DNA al momento del pulso, no generaría daño de DNA. Finalmente, nuestro método de administración intracelómica vs la incubación en el medio podrían ser un indicativo del porqué se puede detectar EdU a tiempos más prolongados de experimentación (Fig. 4A), que los vistos con BrdU (Mead & Lefebvre, 2014; Muñoz et al., 2015; Salic & Mitchison, 2008). Apoyando, de esta forma, el uso de EdU como un excelente marcador de proliferación.

Los altos niveles de proliferación detectados a los 4 dps (Fig. 4J y Fig. 5) comparados con el resto de los días controles (2dps y 10dps) fue un punto que captó nuestra atención, ya que se presentaba un aumento significativo de la proliferación celular en ausencia de un daño a la médula espinal (Fig. 5). Pensando que este aumento en la proliferación que vimos podía deberse a un efecto del daño en el músculo u otro tejido o a un efecto dependiente del estadio del desarrollo de la larva, decidimos repetir el experimento. Para nuestra sorpresa, la proliferación basal detectada era evidentemente mayor a lo visto en el resto de las condiciones sham a los 2 y 10dps en todas las réplicas que realizamos. Estos resultados nos indican que era un efecto dependiente del estadio larvario de *X. laevis*.

En un trabajo del grupo de la doctora Nancy Papalopulu del año 2015, se mostraron los resultados de sus experimentos que apoyaba nuestras observaciones. Estos científicos

evidenciaron que durante el desarrollo de *X. laevis* existían dos peaks de neurogénesis. El primero se encontraba en el estadio embrionario NF10.5, mientras que el segundo peak estaba en el estadio larvario NF54 (R. R. L. Thuret et al., 2015) que, además, corresponden al periodo en donde comienza la remodelación del SNC para la inervación de las futuras extremidades posteriores de la rana (Nieuwkoop & Faber, 1994).

Considerando que la generación de nuevas neuronas debe estar precedida por un evento de proliferación por parte de los progenitores neurales tal como ocurre en la neurogénesis retinal de *X. laevis* o en la médula espinal de otros modelos animales (Duan et al., 2016; Kha et al., 2020), es de esperar que este proceso ocurra entre los 4 o 6 días posterior al estadio NF50, que es el momento donde nosotros comenzamos la experimentación con los animales. Por lo tanto, es lógico ver un aumento de proliferación celular a los 4dps (Fig. 4J).

Esto, sin embargo, podría interpretarse como un problema para la utilización de los animales en estadio NF50 WT para nuestro estudio de neurogénesis pensando que los efectos del aumento de la proliferación celular que vimos en la médula espinal a los 2 y 4dpt (Fig. 4, Fig. 5 y Fig. 6) podrían ser debido al estadio del desarrollo y próximo peak de neurogénesis y no debido a la transección. Sin embargo, un dato importante de mencionar en base a la experiencia es que hemos visto que la transección de la médula espinal retrasa el desarrollo del animal (datos del laboratorio no mostrados), por lo tanto, nosotros creemos que este efecto que se ve a los 2 y 4dpt es realmente producto de la transección del animal.

En resumen, estos resultados indicarían que:

- 1- El método de EdU establecido, es una muy buena metodología para el estudio de proliferación celular en la médula espinal de *X. laevis*.
- 2- El daño produce un aumento de la proliferación de las células Sox2+.
- 3- Las células doblemente marcadas como Sox2+/EdU+, disminuyen luego de los 10dpt. Esto abre la incógnita de saber qué está pasando con esta célula, es decir, habrán proliferado hasta diluir la marca de EdU (4 ciclos de división) o se diferenciaron hacia un linaje no determinado en esta primera etapa.

## **2. Neurogénesis en Respuesta al Daño en *Xenopus laevis***

La neurogénesis es definida como un proceso el cual lleva a la formación de nuevas neuronas a partir de células madre neurales/progenitores neurales. En este proceso puede ser clasificado en cuatro grandes etapas: proliferación celular, diferenciación, migración celular y finalmente su integración a un circuito funcional existente (Gage et al., 2008; Rodríguez-Barrera et al., 2021).

En el proceso de diferenciación neuronal podemos identificar diferentes tipos celulares intermedios que parten desde las NSC/NPC (células indiferenciadas), pasan a neuronas inmaduras DCX+ (marcador de neuroblastos) para terminar en neuronas maduras y funcionales (células diferenciadas) identificadas con el marcador neuronal NeuN (Bonfanti & Seki, 2021; Galán et al., 2017; Georg Kuhn et al., 2016; Gerd Kempermann et al., 2018; Mathews et al.,

2017; Leal-Galicia et al., 2021). Con estos marcadores nosotros podemos ver el proceso de neurogénesis en dos etapas.

En nuestros experimentos utilizamos a NeuN que, junto a EdU, son una excelente aproximación para observar la proliferación de progenitores que serían futuras neuronas (Fig. 7). Es importante destacar que, en todos los días observados después de la transección, se observó un aumento significativo de las células doblemente positivas para EdU y NeuN al comparar el grupo control sham con el grupo con transección (Fig. 7). Sin embargo, es a los 10dpt donde se ve claramente una superposición de las señales de EdU con NeuN y en un mayor porcentaje del total de las células NeuN cuantificadas en la médula de NF50 WT (Fig. 7W, W\* y Fig. 8). Creemos que, estos 10 días, es tiempo suficiente para que una célula EdU/Sox2 +, llegue a diferenciarse en una célula con características morfológicas tipo neuronales (Muñoz et al., 2015) doblemente positivas para EdU/NeuN (Fig.7).

Se hace evidente al observar los distintos días post transección, que las células positivas EdU van marcando una trayectoria o avance desde su origen en la zona endimaria a los 2dpt (Fig. 7), hasta llegar a la zona en donde se encuentran las neuronas maduras y funcionales de la médula espinal en *X. laevis* a los 10dpt (Edwards-Faret et al., 2021; Méndez-Olivos et al., 2017). Cabe destacar que hay una correlación entre el día (10dpt) en que encontramos el mayor número de neuronas EdU+/NeuN+ con lo que se observa en la recuperación funcional de los animales NF50 (Muñoz et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, el proceso de neurogénesis culmina con la integración de las nuevas neuronas generadas, en un circuito funcional existente (Leal-Galicia et al., 2021)

y aunque no podemos evidencia este hecho por la disponibilidad de la técnica, pudimos de forma indirecta hacerlo, al determinar la posición de las células Edu/NeuN+ en la médula espinal (Fig. 7W y W\*).

Un dato interesante de tener en cuenta es que existe una proporción inversa entre el número de células Sox2+/EdU+ y NeuN+/EdU+ (Fig. 6 y Fig. 8). Mientras que a los 2 y 4dpt existen mucha marca de Sox2+/EdU y poca de NeuN+/EdU+, a los 10dpt se observa una inversión de las magnitudes.

Este proceso de neurogénesis también fue observado en nuestro laboratorio con otra aproximación experimental, trasplante de células de médula espinal. Se demostró que transplantando células desde un estadio regenerativo de *X. laevis* NF50 a un estadio no regenerativo NF66, las células NSC/NPC aisladas de la médula espinal del organismo donador proliferaban en el sitio de trasplante del animal aceptor donde, además, eran capaces de diferenciarse hacia neuronas maduras NeuN+ (Méndez-Olivos et al., 2017).

En conjunto, estos resultados demuestran que en respuesta al daño existe neurogénesis en la médula espinal de *X. laevis* lo que es evidenciada con la utilización del marcador de neurona madura NeuN. Por lo tanto, nuestros experimentos sugieren que la neurogénesis podría ser uno de los mecanismos que tiene disponibles la rana *X. laevis* para inducir la regeneración de la médula espinal en estadios larvales.

### **3. Lin28: Proteína de Unión a RNA**

Parte del esfuerzo de la comunidad científica por comprender los mecanismos que subyacen la regeneración, se ha centrado en identificar genes factores o rutas de señalización claves que estarían involucrados en el proceso regenerativo con el propósito de generar terapias para ayudar al ser humano en diferentes patologías (Cimadamore et al., 2013; Hui et al., 2015; Morgado et al., 2016; Muñoz et al., 2015; Peñailillo et al., 2021; Romer-Seibert et al., 2019; Shen et al., 2022).

Diversas proteínas han sido identificadas, siendo de particular interés para nosotros la proteína de unión a RNA Lin28 (Moss and Tang; 2003), la cual fue descrita por primera vez como un gen heterocrónico que regula la progresión de los estadios larvales del desarrollo en *C. elegans* (V Ambros & Horvitz, 1984). A pesar de que en el último tiempo se han incrementado los estudios que involucran a Lin28, aún queda por entender mucho del mecanismo de acción de Lin28 por la vía de Let7 independiente y su rol en proliferación, neurogénesis y regeneración.

#### **3.1. Efecto de Lin28 en la Proliferación Celular**

En la actualidad, diversos son los estudios que se han enfocado en describir el efecto que tiene Lin28a en la regulación de la proliferación de progenitores neurales y neurogénesis tanto en ausencia como en presencia de daño como también en la proliferación y regeneración de tejidos (Balzer et al., 2010; Bhuiyan et al., 2018; Cimadamore et al., 2013; Faunes, 2020; Gorsuch et al., 2017; Nathan et al., 2020; Romer-Seibert et al., 2019; Shyh-Chang et al., 2013; Wang et al., 2018; Xia et al., 2018; M. Yang et al., 2015; Yao et al., 2016; Yue et al., 2014).

Varios de estos estudios demuestran efectos contradictorios, pero se cree que la acción de Lin28a podría depender en gran medida de la región de estudio, del modelo de experimentación utilizado y de la temporalidad en cuanto al estado del desarrollo en el que se encuentre el organismo (Balzer et al., 2010; Bhuiyan et al., 2018; Jang et al., 2019; Nathan et al., 2020; Robinton et al., 2019; Romer-Seibert et al., 2019; M. Yang et al., 2015).

Nuestros resultados con animales transgénico para la sobre expresión de la proteína Lin28a (Faunes et al., 2017; Gundermann et al., 2019), muestran un aumento de la proliferación celular de los NSC y/o NPC a los 6 dpHS de un promedio de 20 células EdU+ por sección en los controles no transgénicos a casi 80 células por sección en los animales que sobre expresaban Lin28a (Fig 12 y Fig. 13), resultados que se apoyan con lo descrito por Cimadamore y colaboradores, en que la sobre expresión de Lin28a rescataba a las células de un defecto proliferativo debido a la disminución de Sox2, potenciando la proliferación de los progenitores neurales (Cimadamore et al., 2013). Además, observamos el efecto leaky del transgénico, ya que, en aquellos animales positivos para Lin28a a los cuales no se les indujo la sobre expresión de Lin28a, se ve un aumento de la proliferación basal de casi el doble de lo observado en los controles de animales no positivos para el transgén (Fig. 12 y Fig. 13).

Similar a lo visto en experimentos de respuesta al daño (Fig. 4), en donde se observa alrededor de un 45% de células Sox2+/EdU+, como consecuencia a la sobre expresión de Lin28a en ausencia de daño. En estas mismas condiciones también aumenta el número de células doblemente positivas para Sox2 y EdU sólo que en esta caso la colocalización es menor y cercana al 20% de células Sox2+ (Fig. 14), demostrando que el aumento de la proliferación

celular es en parte dado por la entrada de los progenitores neurales al ciclo celular (Cimadamore et al., 2013; Muñoz et al., 2015; Yao et al., 2016). Esto nos sugeriría que Lin28a podría regular a los progenitores neurales por medio de Sox2 en NF50.

Existe importante evidencia que apoya nuestra hipótesis, en donde se ha visto una interacción física de Lin28a con Sox2, y experimentos que indican que podrían interactuar en diferentes etapas de los procesos de proliferación y diferenciación celular (Cimadamore et al., 2013; Gorsuch et al., 2017; Morgado et al., 2016; Romer-Seibert et al., 2019). Además, existiría una asociación de estas dos proteínas a través de complejos celulares (Jesse L. Cox et al., 2010) o también a nivel de la regulación génica, en donde Sox2 se une al promotor de Lin28a regulando su expresión (Cimadamore et al., 2013).

Producto del aumento del porcentaje de células Sox2 que entraban al ciclo celular, observamos que, en las 3 condiciones comparadas, el porcentaje de células EdU+ que eran además Sox2+ del universo de células que estaban proliferando (EdU+) no se observaban diferencias significativas. Con esto dedujimos que la sobre expresión de Lin28a, no está ejerciendo efecto solamente en los progenitores Sox2 sino que también en otra población celular no identificada.

Apoyando nuestra propuesta de que la sobre expresión de Lin28a podría inducir la proliferación de los NSC/NPC realizamos un experimento piloto en donde medimos los niveles del mensajero de Nestin, marcador de proliferación y diferenciación de NSC/NPC. En este caso, Nestin mostró una tendencia al aumento a los 6 dpt que finalmente a los 10 dpt se volvió significativo (Fig 16C), sugiriendo indirectamente que hubo proliferación celular y

probablemente a tiempos posteriores podría existir una diferenciación hacia linaje neuronal (Edwards-Faret et al., 2021; Zhou et al., 2021).

### **3.2. Efecto de Lin28 en la Neurogénesis**

El efecto que se ha visto con Lin28a, no se centra sólo en la regulación de la proliferación de NSC/NPC en diferentes tejidos, si no que, también se ha visto que Lin28a regula el destino de los progenitores y mejoraría la regeneración celular (Balzer et al., 2010; Cimadamore et al., 2013; Faunes et al., 2017; Herrlinger et al., 2019; Kempfle et al., 2020; X. J. Li & Doetzlhofer, 2020; Nathan et al., 2020; Robinton et al., 2019; Romer-Seibert et al., 2019; Shyh-Chang et al., 2013; Wang et al., 2018; M. Yang et al., 2015; Yao et al., 2016). Sin embargo, muy poco se sabe del efecto de Lin28a en la neurogénesis de la médula espinal y en la regeneración de ésta.

Nuestros resultados indican que la sobre expresión de Lin28a potenciaría el proceso de neurogénesis en ausencia de daño en la médula espinal de *X. laevis* en estadios regenerativos NF50 (Fig. 17 y Fig. 18) a los 6 dpHS a niveles muy parecidos a los vistos en presencia de un daño a la médula espinal a los 10 dpt (Fig. 4). Efecto similar se ha observado en otros tejidos con la sobre expresión de Lin28a (Faunes et al., 2017; Shyh-Chang et al., 2013; Wang et al., 2018; Y. Zhang et al., 2019).

Posterior a la sobre expresión de Lin28a, genes relacionados con la neurogénesis como DCX y NRG2 también cambian a nivel del mensajero. Ambos genes mostraron un aumento significativo al compararlo con sus respectivos controles (Fig 19). Mientras que genes como *Ascl1*, *NeuroD1* y *NRG3*, presentan un cambio no significativo, pero tienden al aumento al

compararlos con sus controles sin sobre expresión (Fig. 19). Un efecto similar se ha visto en la médula espinal en respuesta al daño, posterior a la transección existe un aumento de marcadores relacionados a la neurogénesis apoyando la hipótesis de neurogénesis en respuesta al daño (Edwards-Faret et al., 2021; Muñoz et al., 2015). Este fenómeno apoya nuestra hipótesis de que Lin28a podría inducir a la generación de nuevas neuronas por modulación de los progenitores neurales Sox2+.

### **3.3. Efecto de Lin28 en animales no regenerativos**

Existen muchos estudios en los cuales se han utilizado animales no regenerativos para determinar el efecto de Lin28 y otros factores en la modulación de la proliferación, neurogénesis y regeneración (Budai et al., 2021; Elahi et al., 2021; Herrlinger et al., 2019; Nathan et al., 2020; Shyh-Chang et al., 2013).

Se ha visto que, producto de la sobre expresión de Lin28a en embriones de ratón, se presenta una disminución de los niveles del marcador de progenitores neurales Sox2 (Robinton et al., 2019), gen que se ha demostrado ser clave para que la regeneración ocurra en *X. laevis* (Muñoz et al., 2015). Muy coincidentemente con lo visto en la literatura, nuestros experimentos sugieren que la sobre expresión de Lin28a generaría en animales no regenerativos NF66, una disminución de Sox2 a nivel de la proteína, pero no en los niveles del mensajero, desde las 6 horas y hasta 48 horas después de la sobre expresión (Fig. 20). Esto nos sugeriría que las células Sox2+ podrían haber comenzado a diferenciarse quizás, a neuronas y por esa razón disminuye la expresión de Sox2 a nivel proteico.

Como se mencionó anteriormente, la función de Lin28a es contexto dependiente, ya que, en experimentos en los que se induce la sobre expresión de Lin28a en glías del oído interno de ratones postnatales, se ve un aumento del marcador Sox2 tanto a nivel del mensajero como a nivel de la proteína a través de ensayos de inmunofluorescencia (Kempfle, Judith S. et al 2020), lo que demostraría un rol de Lin28a a favor de la proliferación, a diferencia de lo observado por el grupo de George Q. Daley (Robinton et al., 2019).

Por otro lado, y contrario a la sobre expresión de Lin28a sería estudiar el efecto de la disminución o eliminación de esta proteína de unión a RNA en los individuos de estudio. Se ha visto que en embriones de ratón doble KO para ambos parálogos de Lin28 (Lin28a y Lin28b) se observa una reducción de la proliferación y diferenciación precoz de los NPC en la zona del tubo neural de estos animales (Herrlinger et al., 2019). Si bien no son animales adultos, podría dar luces del proceso que podría ocurrir en *X. laevis* NF66 considerando que, en estos animales, los parálogos de Lin28 son más bien bajos o imperceptibles.

Hay poca evidencia del efecto de la sobre expresión de Lin28a en estadios no regenerativos NF66 de *X. laevis* y a pesar de que nuestros resultados son aún preliminares, en nuestro laboratorio se ha visto que animales transgénicos para Lin28a NF50 a los cuales se les amputó la extremidad posterior y fueron sometidos a HS para sobre expresar Lin28a, regeneraron sus dígitos al llegar al estadio NF66 (Faunes et al., 2017).

En ese mismo trabajo se demostró que la sobre expresión de Lin28a generar un retraso en el desarrollo de *X. laevis*. Por lo tanto, deja una gran pregunta abierta, ¿los animales

mejoraban la regeneración porque se mantenían un mayor tiempo en estadios regenerativos o realmente mejoraban por la acción directa de Lin28a?

Una pregunta que queda abierta es la aparente dicotomía del efecto de la sobre expresión de Lin28a en NF50 y NF66. En estadios larvales del desarrollo de *X. laevis* (NF50) Lin28a potencia la proliferación celular y, además, nuestros resultados sugieren que también aumentaría la presencia de Sox2 en la médula espinal (Fig. 12 y Fig. 15), mientras que en NF66 los resultados preliminares muestran una disminución de Sox2 a nivel proteico después de inducir el aumento de Lin28a a nivel sistémico (Fig 20), pero no llegamos a realizar ensayos de proliferación celular.

Nosotros pensamos que la respuesta está en los primeros estudios del efecto de Lin28 en mutantes del nemátodo *C. elegans*. Se había observado con ensayos de pérdida de función, que el gusano tenía un desarrollo precoz y mostraba una diferenciación acelerada de las células multipotenciales hipodermales adelantando el desarrollo del organismo. En cambio, con experimentos de sobre expresión de Lin28, se promovía la proliferación celular de estas mismas células hipodermales, haciendo que *C. elegans* repitiera el patrón de proliferación del estadio L2 y así, retrasaba su desarrollo (Victor Ambros & Horvitz, 1984; Vadla et al., 2012). En otras palabras, habría un juego entre la división simétrica vs la división asimétrica de los progenitores hipodermales (Faunes; 2020).

Además, el grupo de Thuret en el 2015 demostró que a medida que *X. laevis* avanza en el desarrollo larval desde NF14 a NF50, la duración del ciclo celular de los progenitores neurales se extiende cada vez más. Posterior a NF50 y hasta NF54, hay una caída de la duración del ciclo

celular desde aproximadamente 42 horas a tan solo 35 horas de duración, indicando que los progenitores neurales están produciendo nuevas neuronas, que como previamente se mencionó es lógico de observar porque es el periodo de la 2da ola de neurogénesis que se produce en *X. laevis* (R. R. L. Thuret et al., 2015).

En nuestro caso, con animales NF66 esperaríamos que la duración del ciclo celular pudiera ser similar a la observada en NF50 o incluso mayor, pero con un índice mitótico (tasa de división celular) menor tal se demuestra en el trabajo de Thuret, ensayo que deberíamos realizar en un futuro.

Si bien, nosotros solo realizamos ensayos de ganancia de función de Lin28 tanto en NF50 como en NF66, creemos que experimentos con NF66 podrían comportarse de manera similar a lo que se ha visto en ensayos de pérdida de función de Lin28 en otros modelos, ya que, se ha visto que Lin28a disminuye a medida que *X.laevis* avanza en el desarrollo (Faunes et al., 2017).

Por lo tanto, pensamos que el efecto de la sobre expresión de Lin28a en NF66 promovería más una división asimétrica que simétrica (Faunes, 2020) de los progenitores presentes en la médula espinal de *X.laevis* (Muñoz et al., 2015), de esta forma la sobre expresión de Lin28a no llegaría a ser suficiente para promover el aumento de la proliferación celular de los NSC/NPC.

En conjunto nuestros resultados muestran que existe neurogénesis en respuesta al daño en animales WT NF50 y que, además, la sobre expresión de Lin28a en transgénicos, induce el aumento de la proliferación de las células Sox2 y de la neurogénesis. Por lo tanto, Lin28a es un candidato de estudio para futuros experimentos de regeneración de la médula espinal.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman que uno de los mecanismos disponibles en *X. laevis* para regenerar la médula espinal después de un daño, podría ser la neurogénesis. Para demostrar esto, fue fundamental la utilización de NeuN como marcador de neurona madura que junto a los ensayos de pulso y caza nos permitió detectar neuronas nuevas derivadas probablemente de células Sox2.

Por otra parte, nuestros resultados indican que Lin28a podría ser un gen importante para estudiar regeneración. La sobre expresión potencia la proliferación de las células Sox2 en *X. laevis* NF50 en condiciones de ausencia de daño, lo que podría ser un gen que promueva la neurogénesis en presencia de daño.

Por lo tanto, Lin28a es un excelente candidato de estudio, para realizar experimentos de ganancia y pérdida de función. Ganancia en animales NF66, los cuales no tienen la capacidad

de regenerar la médula espinal después de un daño, esperando que la sobre expresión de Lin28a pueda inducir la regeneración mientras que con ensayos de pérdida de función en NF50 se podría determinar si Lin28 es necesario para la regeneración.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adigun, O. O., Reddy, V., & Varacallo, M. (2020). Anatomy, Back, Spinal Cord. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30725689>
- Ahuja, C. S., Nori, S., Tetreault, L., Wilson, J., Kwon, B., Harrop, J., Choi, D., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery*, *80*(3S), S22–S90. <https://doi.org/10.1093/NEUROS/NYW080>
- Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology*, *10*, 282. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, *124*(3), 319–335. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5861717>
- Alunni, A., & Bally-Cuif, L. (2016). A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development (Cambridge, England)*, *143*(5), 741–753. <https://doi.org/10.1242/dev.122796>
- Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*, *57*(1), 49–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2702689>
- Ambros, V., & Horvitz, H. R. (1984). Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, *226*(4673), 409–416. <https://doi.org/10.1126/science.6494891>
- Ambros, Victor, & Horvitz, H. R. (1984). Heterochronic Mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *226*(4673), 409–416.

<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6494891>

- Amrein, I., Nossowitz, M., Slomianka, L., van Dijk, R. M., Engler, S., Klaus, F., Raineteau, O., & Azim, K. (2015). Septo-temporal distribution and lineage progression of hippocampal neurogenesis in a primate (*Callithrix jacchus*) in comparison to mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(June), 85. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00085>
- Anderson, M. A., Burda, J. E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T. M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B. S., Deming, T. J., & Sofroniew, M. V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*, 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Anjum, A., Yazid, M. D., Daud, M. F., Idris, J., Hwei Ng, A. M., Naicker, A. S., Rashidah Ismail, O. H., Kumar, R. K. A., & Lokanathan, Y. (2020). Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences 2020*, Vol. 21, Page 7533, 21(20), 7533. <https://doi.org/10.3390/IJMS21207533>
- Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G., & Heintz, N. (2004). Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron*, 41(6), 881–890. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00140-0)
- Ashammakhi, N., Kim, H. J., Ehsanipour, A., Bierman, R. D., Kaarela, O., Xue, C., Khademhosseini, A., & Seidlits, S. K. (2019). Regenerative Therapies for Spinal Cord Injury. In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 25, Issue 6, pp. 471–491). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0182>
- Balzer, E., Heine, C., Jiang, Q., Lee, V. M., Moss, E. G., Abbott, A. L., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E. A., Lau, N. C., Bartel, D. P., Horvitz, H. R., Ambros, V., Ambros, V., Horvitz, H. R., Bain, G., Ray, W. J., Yao, M., Gottlieb, D. I., Balagopal, V., ... Chai, L. (2010). LIN28 alters cell fate succession and acts independently of the let-7 microRNA during neurogliogenesis in vitro. *Development (Cambridge, England)*, 137(6), 891–900. <https://doi.org/10.1242/dev.042895>
- Balzer, E., & Moss, E. G. (2007). Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. *RNA Biology*, 4(1), 16–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617744>
- Barnabé-Heider, F., & Frisén, J. (2008). Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell*, 3(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.06.011>
- Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieder, F. W., Meletis, K., & Frisén, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*, 7(4), 470–482. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.014>
- Benraiss, A., Arsanto, J. P., Coulon, J., & Thouveny, Y. (1999). Neurogenesis during caudal

- spinal cord regeneration in adult newts. *Development Genes and Evolution*, 209(6), 363–369. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10370118>
- Bergmann, O., Spalding, K. L., & Frisé, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a018994. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018994>
- Bhuiyan, M. I. H., Kim, S. Y., & Cho, K. O. (2018). Lin28 overexpression inhibits neurite outgrowth of primary cortical neurons in vitro. *Undefined*, 78(4), 297–304. <https://doi.org/10.21307/ANE-2018-028>
- Bican, O., Minagar, A., & Pruitt, A. A. (2013). The Spinal Cord. A Review of Functional Neuroanatomy. *Neurologic Clinics*, 31(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.NCL.2012.09.009>
- Bonfanti, L., & Seki, T. (2021). The PSA-NCAM-Positive “Immature” Neurons: An Old Discovery Providing New Vistas on Brain Structural Plasticity. *Cells*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/cells10102542>
- Borodinsky, L. N. (2017). *Xenopus laevis* as a model organism for the study of spinal cord formation, development, function and regeneration. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 11, p. 90). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00090>
- Buchholz, D. R. (2015). More similar than you think: Frog metamorphosis as a model of human perinatal endocrinology. *Developmental Biology*, 408(2), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.02.018>
- Budai, Z., Al-Zaeed, N., Szentesi, P., Halász, H., Csernoch, L., Szondy, Z., & Sarang, Z. (2021). Impaired Skeletal Muscle Development and Regeneration in Transglutaminase 2 Knockout Mice. *Cells*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/CELLS10113089>
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron*, 81(2), 229–248. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2013.12.034>
- Cao, G., Gao, Z., Jiang, Y., & Chu, M. (2020). *Lin28* gene and mammalian puberty. *Molecular Reproduction and Development*, 87(5), 525–533. <https://doi.org/10.1002/mrd.23347>
- Cheng, S.-W., Tsai, H.-W., Lin, Y.-J., Cheng, P.-N., Chang, Y.-C., Yen, C.-J., Huang, H.-P., Chuang, Y.-P., Chang, T.-T., Lee, C.-T., Chao, A., Chou, C.-Y., Chan, S.-H., Chow, N.-H., & Ho, C.-L. (2013). Lin28B is an oncofetal circulating cancer stem cell-like marker associated with recurrence of hepatocellular carcinoma. *PloS One*, 8(11), e80053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080053>
- Chien, C. S., Wang, M. L., Chu, P. Y., Chang, Y. L., Liu, W. H., Yu, C. C., Lan, Y. T., Huang, P. I., Lee, Y. Y., Chen, Y. W., Lo, W. L., & Chiou, S. H. (2015). Lin28B/Let-7

- Regulates Expression of Oct4 and Sox2 and Reprograms Oral Squamous Cell Carcinoma Cells to a Stem-like State. *Cancer Research*, 75(12), 2553–2565. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2215>
- Cigliola, V., Becker, C. J., & Poss, K. D. (2020). Building bridges, not walls: Spinal cord regeneration in zebrafish. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 13(5). <https://doi.org/10.1242/DMM.044131/225225>
- Cimadamore, F., Amador-Arjona, A., Chen, C., Huang, C. T., & Terskikh, A. V. (2013). SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), E3017–E3026. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1220176110/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Cline, H. T., & Kelly, D. (2012). *Xenopus* as an experimental system for developmental neuroscience: Introduction to a special issue. *Developmental Neurobiology*, 72(4), 463–464. <https://doi.org/10.1002/dneu.22012>
- Courtine, G., & Sofroniew, M. V. (2019). Spinal cord repair: advances in biology and technology. In *Nature Medicine* (Vol. 25, Issue 6, pp. 898–908). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0475-6>
- Coyoy-Salgado, A., Segura-Urbe, J. J., Guerra-Araiza, C., Orozco-Suárez, S., Salgado-Ceballos, H., Feria-Romero, I. A., Gallardo, J. M., & Orozco-Barrios, C. E. (2019). The Importance of Natural Antioxidants in the Treatment of Spinal Cord Injury in Animal Models: An Overview. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/3642491>
- D. Chichung Lie, Hongjun Song, Sophia A. Colamarino, Guo-li Ming, & Gage, F. H. (2004). *NEUROGENESIS IN THE ADULT BRAIN: New Strategies for Central Nervous System Diseases*. [http://www.annualreviews.org.ezproxy.puc.cl/doi/full/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121631?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed](http://www.annualreviews.org.ezproxy.puc.cl/doi/full/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121631?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed)
- Deng, W. (2010). Neurobiology of injury to the developing brain. *Nature Reviews. Neurology*, 6(6), 328–336. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.53>
- Duan, H., Song, W., Zhao, W., Gao, Y., Yang, Z., & Li, X. (2016). Endogenous neurogenesis in adult mammals after spinal cord injury. *Science China Life Sciences* 2016 59:12, 59(12), 1313–1318. <https://doi.org/10.1007/S11427-016-0205-2>
- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., & Dumont, A. S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: Pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, 24(5), 254–264. <https://doi.org/10.1097/00002826-200109000-00002>

- Duncan, G. J., Manesh, S. B., Hilton, B. J., Assinck, P., Plemel, J. R., & Tetzlaff, W. (2020). The fate and function of oligodendrocyte progenitor cells after traumatic spinal cord injury. In *GLIA* (Vol. 68, Issue 2, pp. 227–245). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23706>
- Duran, R. C. D., Yan, H., Zheng, Y., Huang, X., Grill, R., Kim, D. H., Cao, Q., & Wu, J. Q. (2017). The systematic analysis of coding and long non-coding RNAs in the sub-chronic and chronic stages of spinal cord injury. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep41008>
- Echeverri, K. (2020). The various routes to functional regeneration in the central nervous system. In *Communications Biology* (Vol. 3, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0773-z>
- Edwards-Faret, G., Cebrián-Silla, A., Méndez-Olivos, E. E., González-Pinto, K., García-Verdugo, J. M., & Larraín, J. (2018). Cellular composition and organization of the spinal cord central canal during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Neurology*, 526(10), 1712–1732. <https://doi.org/10.1002/CNE.24441>
- Edwards-Faret, G., González-Pinto, K., Cebrián-Silla, A., Peñailillo, J., García-Verdugo, J. M., & Larraín, J. (2021). Cellular response to spinal cord injury in regenerative and non-regenerative stages in *Xenopus laevis*. *Neural Development*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S13064-021-00152-2>
- Edwards-Faret, G., Muñoz, R., Méndez-Olivos, E. E., Lee-Liu, D., Tapia, V. S., & Larraín, J. (2017). Spinal cord regeneration in *Xenopus laevis*. *Nature Protocols*, 12(2), 372–389. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.177>
- Elahi, A., Emerson, J., Rudlong, J., Keillor, J. W., Salois, G., Visca, A., Girardi, P., Johnson, G. V. W., & Pröschel, C. (2021). Deletion or Inhibition of Astrocytic Transglutaminase 2 Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Cells* 2021, Vol. 10, Page 2942, 10(11), 2942. <https://doi.org/10.3390/CELLS10112942>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Faunes, F. (2020). Role and Regulation of Lin28 in Progenitor Cells During Central Nervous System Development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1326, 55–72. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2020\\_607](https://doi.org/10.1007/5584_2020_607)
- Faunes, F., Gundermann, D. G., Muñoz, R., Bruno, R., & Larraín, J. (2017). The heterochronic gene Lin28 regulates amphibian metamorphosis through disturbance of thyroid hormone function. *Developmental Biology*, 425(2), 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.026>

- Faunes, F., & Larraín, J. (2016). Conservation in the involvement of heterochronic genes and hormones during developmental transitions. *Developmental Biology*, *416*(1), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.013>
- Fei, J. F., Schuez, M., Tazaki, A., Taniguchi, Y., Roensch, K., & Tanaka, E. M. (2014). CRISPR-Mediated Genomic Deletion of Sox2 in the Axolotl Shows a Requirement in Spinal Cord Neural Stem Cell Amplification during Tail Regeneration. *Stem Cell Reports*, *3*(3), 444. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2014.06.018>
- Ferretti, P., Zhang, F., & O’Neill, P. (2003). Changes in spinal cord regenerative ability through phylogenesis and development: lessons to be learnt. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *226*(2), 245–256. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10226>
- Frostell, A., Hakim, R., Thelin, E. P., Mattsson, P., & Svensson, M. (2016). A Review of the Segmental Diameter of the Healthy Human Spinal Cord. *Frontiers in Neurology*, *7*, 238. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00238>
- Gaete, M., Muñoz, R., Sánchez, N., Tampe, R., Moreno, M., Contreras, E. G., Lee-Liu, D., & Larraín, J. (2012). Spinal cord regeneration in *Xenopus* tadpoles proceeds through activation of Sox2-positive cells. *Neural Development*, *7*, 13. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-13>
- Gage, F., Kempermann, G., & Song, H. (2008). *Adult Neurogenesis*. CSHL Press. <https://books.google.com/books?id=5Kyahdob-NsC&pgis=1>
- Galán, L., Gómez-Pinedo, U., Guerrero, A., García-Verdugo, J. M., & Matías-Guiu, J. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis modifies progenitor neural proliferation in adult classic neurogenic brain niches. *BMC Neurology*, *17*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12883-017-0956-5/FIGURES/3>
- Ganapathy, M. K., Reddy, V., & Tadi, P. (2020). Neuroanatomy, Spinal Cord Morphology. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545206/#article-849.s1>
- Gaudet, A. D., & Fonken, L. K. (2018). Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *15*(3), 554–577. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0630-7>
- Gensel, J. C., & Zhang, B. (2015). Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Research*, *1619*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.045>
- Georg Kuhn, H. G., Eisch, A. J., Spalding, K., & Peterson, D. A. (2016). Detection and Phenotypic Characterization of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(3), a025981. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025981>
- Geuna, S., Borrión, P., Fornaro, M., & Giacobini-Robecchi, M. G. (2001). Adult stem cells

- and neurogenesis: historical roots and state of the art. *The Anatomical Record*, 265(3), 132–141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458328>
- Gheusi, G., Lepousez, G., & Lledo, P.-M. (2013). Adult-born neurons in the olfactory bulb: integration and functional consequences. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 15, 49–72. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2012\\_228](https://doi.org/10.1007/7854_2012_228)
- Godwin, J. (2014). The promise of perfect adult tissue repair and regeneration in mammals: Learning from regenerative amphibians and fish. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 36(9), 861–871. <https://doi.org/10.1002/bies.201300144>
- Gorsuch, R. A., Lahne, M., Yarka, C. E., Petravick, M. E., Li, J., & Hyde, D. R. (2017). Sox2 regulates Müller glia reprogramming and proliferation in the regenerating zebrafish retina via Lin28 and Ascl1a. *Experimental Eye Research*, 161, 174–192. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2017.05.012>
- Gundermann, D. G., Martínez, J., De Kervor, G., González-Pinto, K., Larraín, J., & Faunes, F. (2019). Overexpression of Lin28a delays *Xenopus* metamorphosis and down-regulates albumin independently of its translational regulation domain. *Developmental Dynamics*, 248(10), 969–978. <https://doi.org/10.1002/DVDY.98>
- Guo, Y, Ma, L., Cristofanilli, M., Hart, R. P., Hao, A., & Schachner, M. (2011). Transcription factor Sox11b is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *Neuroscience*, 172, 329–341. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.026>
- Guo, Yingqiu, Chen, Y., Ito, H., Watanabe, A., Ge, X., Kodama, T., & Aburatani, H. (2006). Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene*, 384, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.07.011>
- Hagen, E., Rekand, T., Gilhus, N., & Grønning, M. (2012). Traumatiske ryggmargsskader - forekomst, skademekanismer og forløp. *Tidsskrift for Den Norske Legerforening*, 132(7), 831–837. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.10.0859>
- Hagey, D. W., Klum, S., Kurtsdotter, I., Zaouter, C., Topcic, D., Andersson, O., Bergsland, M., & Muhr, J. (2018). SOX2 regulates common and specific stem cell features in the CNS and endoderm derived organs. *PLOS Genetics*, 14(2), e1007224. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007224>
- Hanslik, K. L., Allen, S. R., Harkenrider, T. L., Fogerson, S. M., Guadarrama, E., & Morgan, J. R. (2019). Regenerative capacity in the lamprey spinal cord is not altered after a repeated transection. *PLOS ONE*, 14(1), e0204193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204193>
- Harland, R. M., & Grainger, R. M. (2011). *Xenopus* research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends in Genetics : TIG*, 27(12), 507–515.

<https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.08.003>

- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., & Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental Biology*, 229(1), 15–30. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9962>
- Herrlinger, S., Shao, Q., Yang, M., Chang, Q., Liu, Y., Pan, X., Yin, H., Xie, L. W., & Chen, J. F. (2019). Lin28-mediated temporal promotion of protein synthesis is crucial for neural progenitor cell maintenance and brain development in mice. *Development (Cambridge)*, 146(10). <https://doi.org/10.1242/dev.173765>
- Horner, P. J., & Gage, F. H. (2000). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, 407(6807), 963–970. <https://doi.org/10.1038/35039559>
- Hui, S. P., Nag, T. C., & Ghosh, S. (2015). Characterization of Proliferating Neural Progenitors after Spinal Cord Injury in Adult Zebrafish. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0143595>
- Hutson, T. H., & Di Giovanni, S. (2019). The translational landscape in spinal cord injury: focus on neuroplasticity and regeneration. *Nature Reviews Neurology*, 15(12), 732–745. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0280-3>
- Ishibashi, S., Kroll, K. L., & Amaya, E. (2008). A method for generating transgenic frog embryos. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 461, 447–466. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-483-8\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-483-8_31)
- Jang, H. J., Kim, J. Y., Kim, S. Y., & Cho, K. O. (2019). Persistent Lin28 Expression Impairs Neurite Outgrowth and Cognitive Function in the Developing Mouse Neocortex. *Molecular Neurobiology*, 56(5), 3780–3795. <https://doi.org/10.1007/S12035-018-1297-0/FIGURES/7>
- Jin, K., Minami, M., Lan, J. Q., Mao, X. O., Bateur, S., Simon, R. P., & Greenberg, D. A. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4710–4715. <https://doi.org/10.1073/pnas.081011098>
- Jun-Hao, E. T., Gupta, R. R., & Shyh-Chang, N. (2016). Lin28 and let-7 in the Metabolic Physiology of Aging. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 27, Issue 3, pp. 132–141). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.006>
- JW, S., M, G., MV, S., G, C., & MA, A. (2021). Engineering spinal cord repair. *Current Opinion in Biotechnology*, 72, 48–53. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2021.10.006>
- Kawahara, H., Imai, T., & Okano, H. (2012). MicroRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 30. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00030>
- Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis*

*Foundation Symposium*, 231, 220–235; discussion 235–41, 302–306.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11131541>

- Kempermann, Gerd, Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., Kuhn, H. G., Jessberger, S., Frankland, P. W., Cameron, H. A., Gould, E., Hen, R., Abrous, D. N., Toni, N., Schinder, A. F., Zhao, X., Lucassen, P. J., & Frisé, J. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*, 23(1), 25–30.  
<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2018.04.004>
- Kempermann, Gerd, Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a018812-.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018812>
- Kempfle, J. S., Luu, N. N. C., Petrillo, M., Al-Asad, R., Zhang, A., & Edge, A. S. B. (2020). Lin28 reprograms inner ear glia to a neuronal fate. *STEM CELLS*, 38(7), 890–903.  
<https://doi.org/10.1002/STEM.3181>
- Kha, C. X., Guerin, D. J., & Tseng, K. A. S. (2020). Studying In Vivo Retinal Progenitor Cell Proliferation in *Xenopus laevis*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2092, 19–33. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0175-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0175-4_2)
- Kishimoto, N., Shimizu, K., & Sawamoto, K. (2012). Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Disease Models & Mechanisms*, 5(2), 200–209.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.007336>
- Kizil, C., Kyritsis, N., Dudczig, S., Kroehne, V., Freudenreich, D., Kaslin, J., & Brand, M. (2012). Regenerative neurogenesis from neural progenitor cells requires injury-induced expression of Gata3. *Developmental Cell*, 23(6), 1230–1237.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.014>
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 149–184.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Kwon, B. K., Sekhon, L. H., & Fehlings, M. G. (2010). Emerging repair, regeneration, and translational research advances for spinal cord injury. *Spine*, 35(21 Suppl), S263–70.  
<https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181f3286d>
- Leal-Galicia, P., Chávez-Hernández, M. E., Mata, F., Mata-Luévanos, J., Rodríguez-Serrano, L. M., Tapia-de-Jesús, A., & Buenrostro-Jáuregui, M. H. (2021). Adult Neurogenesis: A Story Ranging from Controversial New Neurogenic Areas and Human Adult Neurogenesis to Molecular Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11489. <https://doi.org/10.3390/IJMS222111489>
- Lee-Liu, D., Edwards-Faret, G., Tapia, V. S., & Larraín, J. (2013). Spinal cord regeneration: Lessons for mammals from non-mammalian vertebrates. *Genesis*, 51(8), 529–544.

<https://doi.org/10.1002/DVG.22406>

- Lee-Liu, D., Méndez-Olivos, E. E., Muñoz, R., & Larraín, J. (2017). The African clawed frog *Xenopus laevis*: A model organism to study regeneration of the central nervous system. In *Neuroscience Letters* (Vol. 652, pp. 82–93). Elsevier Ireland Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.09.054>
- Lee-Liu, D., Moreno, M., Almonacid, L. I., Tapia, V. S., Muñoz, R., von Marées, J., Gaete, M., Melo, F., & Larraín, J. (2014). Genome-wide expression profile of the response to spinal cord injury in *Xenopus laevis* reveals extensive differences between regenerative and non-regenerative stages. *Neural Development*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-9-12>
- Leuner, B., & Gould, E. (2010). Structural plasticity and hippocampal function. *Annual Review of Psychology*, 61, 111–140, C1-3.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.100359>
- Li, X. J., & Doetzlhofer, A. (2020). LIN28B/let-7 control the ability of neonatal murine auditory supporting cells to generate hair cells through mTOR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(36), 22225–22236. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2000417117/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Li, Y., & Guo, W. (2020). Neural Stem Cell Niche and Adult Neurogenesis. *The Neuroscientist*, 107385842093903. <https://doi.org/10.1177/1073858420939034>
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2016). The adult ventricular–subventricular zone (V-SVZ) and olfactory bulb (OB) neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5), a018820. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>
- Lin, G., Chen, Y., & Slack, J. M. W. (2007). Regeneration of neural crest derivatives in the *Xenopus* tadpole tail. *BMC Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-56>
- Lin, R., & Iacovitti, L. (2015). Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Research*, 1628(Pt B), 327–342.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.029>
- Lindsey, B. W., & Tropepe, V. (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Progress in Neurobiology*, 80(6), 281–307.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.007>
- Liu, Y., Liu, Q., Li, R., Yang, Z., Huang, Z., Huang, Z., Liu, J., Wu, X., Lin, J., Wu, X., & Zhu, Q. (2019). Three-Dimensional Changes in Cervical Spinal Cord Microvasculature During the Chronic Phase of Hemicontusion Spinal Cord Injury in Rats. *World Neurosurgery*, 126, e385–e391. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.02.061>
- Luisetto, M. (2019). The Evolution of the Nervous System: Invertebrates vs. Vertebrates a

- useful Instrument and Model to Research New Pharmacological Strategies in some Human Neurodegenerative Conditions. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 5(5), 420–433. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2019.05.000960>
- Malatesta, P., Hartfuss, E., & Gotz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*, 127(24), 5253–5263. <http://dev.biologists.org/content/127/24/5253.long>
- Maldonado-Lasunción, I., Verhaagen, J., & Oudega, M. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Choreography Supporting Spinal Cord Repair. *Neurotherapeutics*, 15(3), 578–587. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0629-0>
- Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J. M., Dennis, L. M., Volkert, T. L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P. A., Bartel, D. P., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134(3), 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.020>
- Martín-Suárez, S., Abiega, O., Ricobaraza, A., Hernandez-Alcoceba, R., & Encinas, J. M. (2020). Alterations of the Hippocampal Neurogenic Niche in a Mouse Model of Dravet Syndrome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 654. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00654>
- Mathews, K. J., Allen, K. M., Boerrigter, D., Ball, H., Shannon Weickert, C., & Double, K. L. (2017). Evidence for reduced neurogenesis in the aging human hippocampus despite stable stem cell markers. *Aging Cell*, 16(5), 1195–1199. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12641/FORMAT/PDF>
- Mayr, F., & Heinemann, U. (2013). Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA regulation--a structural and functional perspective. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/ijms140816532>
- McKinley, M., O'Loughlin, V., & Bidle, T. (2019). *Anatomy & Physiology: An Integrative Approach* (3rd ed.). McGraw-Hill Education. <https://www.mheducation.com/highered/product/anatomy-physiology-integrative-approach-mckinley-o-loughlin/M9781259398629.html>
- Mead, T. J., & Lefebvre, V. (2014). Proliferation Assays (BrdU and EdU) on Skeletal Tissue Sections. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1130, 233. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-989-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-989-5_17)
- Méndez-Olivos, E., Muñoz, R., & Larraín, J. (2017). Spinal Cord Cells from Pre-metamorphic Stages Differentiate into Neurons and Promote Axon Growth and Regeneration after Transplantation into the Injured Spinal Cord of Non-regenerative *Xenopus laevis* Froglets. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11.

<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00398>

- Merkle, F. T., & Alvarez-Buylla, A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 704–709. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.09.008>
- Milich, L. M., Ryan, C. B., & Lee, J. K. (2019). The origin, fate, and contribution of macrophages to spinal cord injury pathology. *Acta Neuropathologica*, 137(5), 785–797. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01992-3>
- Ming, G.-L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Ming, G., & Song, H. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223–250. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>
- Morgado, A. L., Rodrigues, C. M. P., & Solá, S. (2016). MicroRNA-145 Regulates Neural Stem Cell Differentiation Through the Sox2-Lin28/let-7 Signaling Pathway. *STEM CELLS*, 34(5), 1386–1395. <https://doi.org/10.1002/stem.2309>
- Moss, E G, Lee, R. C., & Ambros, V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell*, 88(5), 637–646. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054503>
- Moss, Eric G, & Tang, L. (2003). Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Developmental Biology*, 258(2), 432–442. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798299>
- Muñoz, R., Edwards-Faret, G., Moreno, M., Zuñiga, N., Cline, H., & Larraín, J. (2015). Regeneration of *Xenopus laevis* spinal cord requires Sox2/3 expressing cells. *Developmental Biology*, 408(2), 229–243. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2015.03.009>
- Nardone, R., Florea, C., Höller, Y., Brigo, F., Versace, V., Lochner, P., Golaszewski, S., & Trinka, E. (2017). Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury. In *Zoology* (Vol. 123, pp. 101–114). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.06.004>
- Nasco | *Xenopus Frogs*. (n.d.). Retrieved September 7, 2020, from [https://www.enasco.com/c/Education-Supplies/Xenopus-Frogs?ic\\_name=education&ic\\_creative=link&ic\\_id=steam\\_cat\\_banners\\_0718](https://www.enasco.com/c/Education-Supplies/Xenopus-Frogs?ic_name=education&ic_creative=link&ic_id=steam_cat_banners_0718)
- Nathan, F. M., Ohtake, Y., Wang, S., Jiang, X., Sami, A., Guo, H., Zhou, F. Q., & Li, S. (2020). Upregulating Lin28a Promotes Axon Regeneration in Adult Mice with Optic Nerve and Spinal Cord Injury. *Molecular Therapy*, 28(8), 1902–1917. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2020.04.010>

- Nicaise, A. M., D'Angelo, A., Ionescu, R.-B., Krzak, G., Willis, C. M., & Pluchino, S. (2021). The role of neural stem cells in regulating glial scar formation and repair. *Cell and Tissue Research*, 1–16. <https://doi.org/10.1007/S00441-021-03554-0/FIGURES/1>
- Nieuwkoop, P., & Faber, J. (1994). *Normal table of Xenopus laevis (Daudin) : a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis* (P. Nieuwkoop & J. Faber (Eds.); 2nd ed.). Garland Pub.
- Ninkovic, J., & Götz, M. (2007). Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.006>
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., & Kriegstein, A. R. (2002). Dividing Precursor Cells of the Embryonic Cortical Ventricular Zone Have Morphological and Molecular Characteristics of Radial Glia. *J. Neurosci.*, 22(8), 3161–3173. <http://www.jneurosci.org/content/22/8/3161.long>
- Peñailillo, J., Palacios, M., Mounieres, C., Muñoz, R., Slater, P. G., De Domenico, E., Patrushev, I., Gilchrist, M., & Larraín, J. (2021). Analysis of the early response to spinal cord injury identified a key role for mTORC1 signaling in the activation of neural stem progenitor cells. *Npj Regenerative Medicine* 2021 6:1, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00179-3>
- Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J. E., LaPierre, R. J., Pothoulakis, C., Hagan, J. P., Iliopoulos, D., Gregory, R. I., Barh, D., Malhotra, R., Ravi, B., Sindhurani, P., Boisvert, F. M., Koningsbruggen, S. van, Navascués, J., Lamond, A. I., Boyerinas, B., Park, S. M., Hau, A., ... al., et. (2011). Lin28A and Lin28B Inhibit let-7 MicroRNA Biogenesis by Distinct Mechanisms. *Cell*, 147(5), 1066–1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.039>
- Polesskaya, A., Cuvellier, S., Naguibneva, I., Duquet, A., Moss, E. G., & Harel-Bellan, A. (2007). Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes & Development*, 21(9), 1125–1138. <https://doi.org/10.1101/gad.415007>
- Porrello, E. R., Mahmoud, A. I., Simpson, E., Hill, J. A., Richardson, J. A., Olson, E. N., & Sadek, H. A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6020), 1078–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1200708>
- Rehfeld, F., Rohde, A. M., Nguyen, D. T. T., & Wulczyn, F. G. (2015). Lin28 and let-7: Ancient milestones on the road from pluripotency to neurogenesis. *Cell and Tissue Research*, 359(1), 145–160. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1872-2>
- Richards, M., Tan, S.-P., Tan, J.-H., Chan, W.-K., & Bongso, A. (2004). The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 22(1), 51–64. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-1-51>

- Roberts, A., Li, W. C., & Soffe, S. R. (2012). A functional scaffold of CNS neurons for the vertebrates: The developing *Xenopus laevis* spinal cord. *Developmental Neurobiology*, 72(4), 575–584. <https://doi.org/10.1002/DNEU.20889>
- Robinton, D. A., Chal, J., Rocha, E. L. da, Han, A., Yermalovich, A. V., Oginuma, M., Schlaeger, T. M., Sousa, P., Rodriguez, A., Urbach, A., Pourquie, O., & Daley, G. Q. (2019). The Lin28/let-7 Pathway Regulates the Mammalian Caudal Body Axis Elongation Program. *Developmental Cell*, 48(3), 396-405.e3. [https://www.cell.com/developmental-cell/fulltext/S1534-5807\(18\)31084-0?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1534580718310840%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/developmental-cell/fulltext/S1534-5807(18)31084-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1534580718310840%3Fshowall%3Dtrue)
- Rodríguez-Barrera, R., Ibarra, A., Rivas-González, M., García-Sánchez, J., & Mojica-Torres, D. (2021). Neurogenesis after Spinal Cord Injury: State of the Art. *Cells 2021, Vol. 10, Page 1499*, 10(6), 1499. <https://doi.org/10.3390/CELLS10061499>
- Rodriguez-Jimenez, F. J., Vilches, A., Perez-Arago, M. A., Clemente, E., Roman, R., Leal, J., Castro, A. A., Fustero, S., Moreno-Manzano, V., Jendelova, P., Stojkovic, M., & Erceg, S. (2021). Activation of Neurogenesis in Multipotent Stem Cells Cultured In Vitro and in the Spinal Cord Tissue After Severe Injury by Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3. *Neurotherapeutics*, 18(1), 515–533. <https://doi.org/10.1007/S13311-020-00928-0/FIGURES/11>
- Romer-Seibert, J. S., Hartman, N. W., & Moss, E. G. (2019). The RNA-binding protein LIN28 controls progenitor and neuronal cell fate during postnatal neurogenesis. *The FASEB Journal*, 33(3), 3291–3303. <https://doi.org/10.1096/FJ.201801118R>
- Royal College of Obstetricians & Gynaecologists. (2020). *Spinal cord injury | eLearning*. <https://elearning.rcog.org.uk//neurological-disorders/spinal-cord-injury>
- Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D. O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Göritz, C., & Frisé, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6158), 637–640. <https://doi.org/10.1126/science.1242576>
- Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2415–2420. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0712168105>
- Seaberg, R. M., & van der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends in Neurosciences*, 26(3), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00031-6)
- Sehgal, I., & M Das, J. (2020). Anatomy, Back, Spinal Meninges. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31613535>

- Sharif-Alhoseini, M., Khormali, M., Rezaei, M., Safdarian, M., Hajighadery, A., Khalatbari, M. M., Safdarian, M., Meknatkhah, S., Rezvan, M., Chalangari, M., Derakhshan, P., & Rahimi-Movaghar, V. (2017). Animal models of spinal cord injury: A systematic review. In *Spinal Cord* (Vol. 55, Issue 8, pp. 714–721). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sc.2016.187>
- Sharif-Alhoseini, Mahdi, & Rahimi-Movaghar, V. (2014). Animal Models in Traumatic Spinal Cord Injury. In *Topics in Paraplegia*. InTech. <https://doi.org/10.5772/57189>
- Shen, W.-Y., Fu, X.-H., Cai, J., Li, W.-C., Fan, B.-Y., Pang, Y.-L., Zhao, C.-X., Abula, M., Kong, X.-H., Yao, X., & Feng, S.-Q. (2022). Identification of key genes involved in recovery from spinal cord injury in adult zebrafish. *Neural Regeneration Research*, 17(6), 1334. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327360>
- Shyh-Chang, N., Zhu, H., Yvanka De Soysa, T., Shinoda, G., Seligson, M. T., Tsanov, K. M., Nguyen, L., Asara, J. M., Cantley, L. C., & Daley, G. Q. (2013). Lin28 Enhances Tissue Repair by Reprogramming Cellular Metabolism. *Cell*, 155(4), 778–792. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.09.059>
- Slack, J. M. W., Lin, G., & Chen, Y. (2008). Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(1), 54–63. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7431-1>
- Sofroniew, M. V. (2018). Dissecting spinal cord regeneration perspective. In *Nature* (Vol. 557, Issue 7705, pp. 343–350). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0068-4>
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends in Immunology*, 41(9), 758–770. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.07.004>
- Tai, W., Xu, X.-M., & Zhang, C.-L. (2020). Regeneration Through in vivo Cell Fate Reprogramming for Neural Repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 107. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00107>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tanaka, E. M., & Ferretti, P. (2009). Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(10), 713–723. <https://doi.org/10.1038/nrn2707>

- Than-Trong, E., & Bally-Cuif, L. (2015). Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system. *Glia*, *63*(8), 1406–1428. <https://doi.org/10.1002/glia.22856>
- Thuret, R. R. L., Ne Auger, H., Papalopulu, N., Auger, H., & Papalopulu, N. (2015). Analysis of neural progenitors from embryogenesis to juvenile adult in *Xenopus laevis* reveals biphasic neurogenesis and continuous lengthening of the cell cycle. *Biology Open*, *4*(12), 1772–1781. <https://doi.org/10.1242/bio.013391>
- Thuret, S., Moon, L. D. F., & Gage, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews. Neuroscience*, *7*(8), 628–643. <https://doi.org/10.1038/nrn1955>
- Tonchev, A. B., Yamashima, T., Zhao, L., Okano, H. J., & Okano, H. (2003). Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *23*(2), 292–301. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00058-7)
- Totoiu, M. O., & Keirstead, H. S. (2005). Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *Journal of Comparative Neurology*, *486*(4), 373–383. <https://doi.org/10.1002/cne.20517>
- Tseng, A. S., & Levin, M. (2008). Tail regeneration in *Xenopus laevis* as a model for understanding tissue repair. In *Journal of Dental Research* (Vol. 87, Issue 9, pp. 806–816). SAGE Publications. <https://doi.org/10.1177/154405910808700909>
- Tsialikas, J., Romer-Seibert, J., Abbott, A. L., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E. A., Lau, N. C., Bartel, D. P., Horvitz, H. R., Ambros, V., Abrahante, J. E., Daul, A. L., Li, M., Volk, M. L., Tennessen, J. M., Miller, E. A., Rougvie, A. E., Ambros, V., Ambros, V., Horvitz, H. R., ... Kharas, M. G. (2015). LIN28: roles and regulation in development and beyond. *Development (Cambridge, England)*, *142*(14), 2397–2404. <https://doi.org/10.1242/dev.117580>
- Tuszynski, M. H., & Steward, O. (2012). Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS. *Neuron*, *74*(5), 777–791. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.006>
- Vadla, B., Kemper, K., Alaimo, J., Heine, C., & Moss, E. G. (2012). lin-28 Controls the Succession of Cell Fate Choices via Two Distinct Activities. *PLOS Genetics*, *8*(3), e1002588. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002588>
- Venkatesh, K., Ghosh, S. K., Mullick, M., Manivasagam, G., & Sen, D. (2019). Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 377, Issue 2, pp. 125–151). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03039-1>
- Viswanathan, S. R., Daley, G. Q., & Gregory, R. I. (2008). Selective blockade of microRNA

- processing by Lin28. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5872), 97–100.  
<https://doi.org/10.1126/science.1154040>
- Wang, X. W., Li, Q., Liu, C. M., Hall, P. A., Jiang, J. J., Katchis, C. D., Kang, S., Dong, B. C., Li, S., & Zhou, F. Q. (2018). Lin28 Signaling Supports Mammalian PNS and CNS Axon Regeneration. *Cell Reports*, 24(10), 2540-2552.e6.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.07.105>
- Willyard, C. (2013). Stem cells: A time to heal. *Nature*, 503(7475), S4-6.  
<https://doi.org/10.1038/503S4a>
- World Health Organization. (2013). *WHO | Spinal cord injury: as many as 500 000 people suffer each year*. World Health Organization; World Health Organization.  
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/spinal-cord-injury-20131202/en/>
- Wurmser, A. E., & Gage, F. H. (2002). Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature*, 416(6880), 485–487. <https://doi.org/10.1038/416485a>
- Xenbase. (n.d.). *Xenbase Home*. Retrieved August 29, 2020, from <http://www.xenbase.org/entry/>
- Xia, X., Teotia, P., & Ahmad, I. (2018). Lin28a regulates neurogliogenesis in mammalian retina through the Igf signaling. *Developmental Biology*, 440(2), 113–128.  
<https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2018.05.007>
- Yang, D. H., & Moss, E. G. (2003). Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expression Patterns*, 3(6), 719–726.  
[https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00140-6)
- Yang, M., Yang, S.-L., Herrlinger, S., Liang, C., Dzieciatkowska, M., Hansen, K. C., Desai, R., Nagy, A., Niswander, L., Moss, E. G., & Chen, J.-F. (2015). Lin28 promotes the proliferative capacity of neural progenitor cells in brain development. *Development*, 142(9). <https://doi.org/10.1242/dev.120543>
- Yao, K., Qiu, S., Tian, L., Snider, W. D., Flannery, J. G., Schaffer, D. V., & Chen, B. (2016). Wnt Regulates Proliferation and Neurogenic Potential of Müller Glial Cells via a Lin28/let-7 miRNA-Dependent Pathway in Adult Mammalian Retinas. *Cell Reports*, 17(1), 165–178. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.08.078>
- Ye, Z., Su, Z., Xie, S., Liu, Y., Wang, Y., Xu, X., Zheng, Y., Zhao, M., & Jiang, L. (2020). Yap-lin28a axis targets let7-WNT pathway to restore progenitors for initiating regeneration. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.55771>
- Yip, P. K., & Malaspina, A. (2012). Spinal cord trauma and the molecular point of no return. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 7, Issue 1, p. 6). BioMed Central.  
<https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-6>

- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Yue, Y., Zhang, D., Jiang, S., Li, A., Guo, A., Wu, X., Xia, X., Cheng, H., Tao, T., & Gu, X. (2014). LIN28 expression in rat spinal cord after injury. *Neurochemical Research*, *39*(5), 862–874. <https://doi.org/10.1007/S11064-014-1278-2>
- Zhang, G., Pizarro, I. V., Swain, G. P., Kang, S. H., & Selzer, M. E. (2014). Neurogenesis in the lamprey central nervous system following spinal cord transection. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(6), 1316–1332. <https://doi.org/10.1002/cne.23485>
- Zhang, Y., Williams, P. R., Jacobi, A., Wang, C., Goel, A., Hirano, A. A., Brecha, N. C., Kerschensteiner, D., & He, Z. (2019). Elevating Growth Factor Responsiveness and Axon Regeneration by Modulating Presynaptic Inputs. *Neuron*, *103*(1), 39-51.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.04.033>
- Zhao, C., Tao, Z., Xue, L., Zeng, Y., Wang, Y., Xu, H., & Yin, Z. Q. (2017). Lin28b stimulates the reprogramming of rat Müller glia to retinal progenitors. *Experimental Cell Research*, *352*(1), 164–174. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2017.02.010>
- Zhao, X., Rouhiainen, A., Li, Z., Guo, S., & Rauvala, H. (2020). Regulation of Neurogenesis in Mouse Brain by HMGB1. *Cells*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071714>
- Zhou, W., Silva, M., Feng, C., Zhao, S., Liu, L., Li, S., Zhong, J., & Zheng, W. (2021). Exosomes derived from human placental mesenchymal stem cells enhanced the recovery of spinal cord injury by activating endogenous neurogenesis. *Stem Cell Research and Therapy*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02248-2/FIGURES/7>