

**Análisis histológico y transcriptómico del proceso regenerativo  
del ajolote *Ambystoma mexicanum***

**Responsable:** Dra. Cynthia Gabriela Sámano Salazar. Profesora Asociada de T.C. Departamento de Ciencias Naturales (DCN), UAM Cuajimalpa

**Co-responsable:** Dr. Ernesto Soto Reyes Solís. Profesor Titular de T.C. Departamento de Ciencias Naturales (DCN), UAM Cuajimalpa

**Participantes:** Dra. Juana Jimena Otero Negrete. Profesora de T.P. Departamento de Ciencias Naturales (DCN), UAM Cuajimalpa

Dr. José Antonio Ocampo. Jefe de proyecto del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuicolas de Cuernavaca (CIBAC), UAM Xochimilco

Dr. Rodrigo González Barrios. Investigador de la Unidad Biomédica en Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología (INCan), México.

**Orientación:** Investigación básica

**Duración:** 2 años (enero 2021-enero 2022)

**Resumen**

El ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) es un anfibio vertebrado que conserva características fenotípicas de la etapa larvaria y tiene la capacidad de regenerar tejidos, extremidades y órganos complejos durante toda su vida, aunque la capacidad regenerativa disminuye conforme a la edad avanzada de los ajolotes. El *Ambystoma mexicanum* es un extraordinario modelo animal debido a que se puede mantener fácilmente en cautiverio, por sus características biológicas, fisiológicas y a su asombrosa capacidad regenerativa. El genoma de ajolote es 10 veces más grande que el del humano y el 70% está constituido por elementos nucleares intercalados repetidos, los cuales no han sido estudiados con detalle y no se ha determinado si cumplen un papel relevante durante el proceso regenerativo. En este proyecto se realizará la caracterización ómica del transcriptoma del *A. mexicanum* en el proceso de regeneración tisular. Los resultados pudieran dar la pauta para descifrar la

maquinaria molecular y el transcriptoma del ajolote mexicano, y así caracterizar a los elementos funcionales del genoma, con la finalidad de comprender en parte los procesos moleculares implicados en el proceso de regeneración en *Ambystoma mexicanum*.

### **Antecedentes**

El ajolote es una salamandra perteneciente al género de anfibios urodelos *Ambystoma* comprende 32 especies y se distribuyen desde el sur de Canadá hasta el centro de México. Entre las 16 especies mexicanas, la más estudiada es *Ambystoma mexicanum*, el cual es endémico de la zona lacustre de Xochimilco y Chalco-Tláhuac en la Ciudad de México (Vázquez-Molina, 2010; Zapata & Solís, 2014). Actualmente, *Ambystoma mexicanum* es una especie en peligro de extinción debido a las actividades del hombre, a la introducción de flora y fauna, y a la contaminación que se ha ido presentando en su hábitat (Vance, 2017; Mena H, 2014). *A. mexicanum* es un anfibio vertebrado que puede vivir tanto en tierra como sumergido en agua, y que conserva características fenotípicas de la etapa larvaria (neotenia) (Demircan, et al., 2016). En cautiverio, los ajolotes presentan mínimos problemas de reproducción y del desarrollo de las crías, y debido a sus características biológicas y fisiológicas, se ha convertido en un modelo animal ideal en investigación (CONABIO, 2011; Farkas, et al., 2015).

Uno de los principales temas de investigación en *A. mexicanum* ha sido el proceso de regeneración de tejidos, ya que es una de las especies vertebrados con mayor capacidad regenerativa en cuestión de semanas puede regenerar extremidades amputadas, cola, sistema nervioso (central y periférico), iris, huesos, músculo y epitelios (McHedlishvili, et al., 2012; Suetsugu et al., 2012; Wu et al., 2015; Tazaki et al., 2017; Haas & Whited, 2017). Los ajolotes contienen células de la piel (fibroblastos) con la capacidad de convertirse en células *blastemales*, es decir células diferenciadas maduras que están cercanas a una herida y adquieren capacidades proliferativas, a través de un proceso de dediferenciación para generar nuevas células y formar los tejidos del órgano o extremidad dañados o perdidos (Bryant, 2002; McCusker, 2011; Sandoval-Guzmán et al, 2014). El blastema es el responsable del procesos de regeneración, el cual está constituido por un conjunto de células progenitoras heterogéneas restringidas donde en el proceso regenerativo existe cierta

“memoria celular” y las células progenitoras desdiferenciadas siempre se diferenciarán en el mismo tipo celular del que provenían para regenerar extremidades dañadas o perdidas (Kragl et al., 2009). Los factores como la edad, mecanismos moleculares e incluso epigenéticos influyen en la transcripción genética durante el proceso regenerativo (Haas & Whited, 2017; Voss et al., 2019). Aunque los ajolotes mantienen la capacidad regenerativa durante toda su vida, incluso siendo adultos, se ha demostrado que el fenómeno de regeneración es menos eficiente conforme a la edad avanzada de los organismos. De tal forma que las larvas y adultos jóvenes tardan días o semanas en regenerar tejidos, mientras que los adultos sexualmente maduros pueden tardar meses en regenerar alguna extremidad (McCusker and Gardiner, 2011; Vieira et al., 2020).

Se han propuesto diversos genes candidatos y transcritos que codifican para proteínas implicadas en la regulación del blastema en *A. mexicanum*, pero no ha sido ampliamente estudiado (Monaghan et al., 2012; Nacu et al., 2013; Darnet et al., 2019). La reciente secuenciación del genoma del Ajolote apunta a que muchos genes y sus productos no han sido aún estudiados, sugiriendo que el éxito del proceso regenerativo a través de la formación del blastema en las extremidades dañadas podría estar relacionado con la caracterización de los nuevos transcritos. De hecho, se puede decir que la regeneración y formación de extremidades funcionales, sin alguna señal de daño, lo cual, sigue siendo un misterio en el ajolote mexicano.

En 2018 se secuenció y ensambló el genoma del ajolote. Se determinó su tamaño (32 GB), que comparado con el humano es enorme (10 veces más grande), donde el 70% está constituido por elementos nucleares intercalados repetidos (LINES, por sus siglas en inglés) (Nowoshilow et al., 2018; Keinath et al., 2015). Estas características, han abierto varias interrogantes; debido a que estos datos fueron obtenidos de ajolotes híbridos y no del ajolote mexicano nativo de Xochimilco; lo cual pudiera ser comparativamente diferente. Adicionalmente, pocos animales presentan tantos elementos genómicos repetidos, y a la fecha no se ha determinado si estos elementos cumplen algún papel relevante durante el proceso de regeneración.

## **Justificación**

Si bien ya se han hecho trabajos sobre la regeneración de extremidades y diferentes órganos de animales urodelos, la mayoría de los estudios se han enfocado en la dinámica de las células progenitoras, con poca atención a los elementos repetidos presentes en el genoma del ajolote *Ambystoma mexicanum* durante el proceso regenerativo. Estos resultados pudieran dar la pauta para empezar a descifrar la maquinaria molecular y particularmente al transcriptoma de este organismo, pues de tener éxito podríamos caracterizar a los elementos funcionales de su genoma, y así comprender en parte los procesos moleculares de las células y tejidos relacionados con el proceso de regeneración en *A. mexicanum*. Esto abriría la pauta para buscar a futuro posibles aplicaciones médicas en la medicina regenerativa de tejidos, órganos e incluso extremidades.

## **Objetivo general**

Caracterización ómica del transcriptoma del *Ambystoma mexicanum* en el proceso de regeneración tisular.

## **Objetivos particulares**

- 1) Mediante secuenciaciones de RNA de alto rendimiento (RNA-seq), analizar el transcriptoma asociados a la regeneración tisular, después de inducir un corte en la cola y las manos de *A. mexicanum* en distintas edades.
- 2) Evaluar a nivel histológico los cambios tisulares que ocurren en la fase temprana de la regeneración, después de inducir un corte en la cola y en las manos en ajolotes adultos de *A. mexicanum*.

## **Hipótesis**

El análisis histológico evidenciará que en el blastema, el proceso regenerativo observado en la cola y de la mano del ajolote *A. mexicanum* es donde se presentarán cambios a nivel transcripcional relacionados con los elementos repetidos, los cuales podrían ser los responsables en parte, de mediar el proceso de regeneración tisular.

## **Metodología**

### **Material biológico**

**Edad y número de organismos:** Ajolotes de *A. mexicanum*, 3 jóvenes de 8 meses de edad, 3 adultos de 24 meses de edad y 3 de más de 4 años de edad.

**Proceso de anestesia:** los organismos se colocarán en una tina llena con agua del humedal de Xochimilco, en el cual se le colorá benzocaína como sedante de los ajolotes. El cual tarda aproximadamente 20 minutos, dependiendo de cada ejemplar.

**Muestras de tejido:** Se tomarán muestras de dos regiones del ajolote: 1) extremo de la cola (2 mm), y 2) de las manos de los ajolotes adultos *A. mexicanum*, y una parte del material conservará en una solución estabilizadora de RNA (RNA-later) y la otra en paraformaldehído

Cabe mencionar que tanto el protocolo de anestesia, como la toma de muestras biológicas de los organismos se llevarán a cabo de acuerdo a los procedimientos establecidos por el personal que trabaja con los ajolotes *A. mexicanum* en el CIBAC, UAM-Xochimilco.

Una parte de las muestras biológicas, se fijarán con paraformaldehído al 4% por 24 h para posteriormente deshidratarlos con gradientes de sacarosa al 10, 15 y 30% y obtener los cortes por congelación en un crióstato.

### **Obtención de cortes histológicos**

Se realizarán en un crióstato a temperatura de -20 °C, para permitir una conservación del tejido mediante la congelación. El grosor de los cortes será de 15 µm, y las muestras se colectarán en un portaobjetos (gelatinizados) para mayor adherencia del tejido. Este procedimiento se realizará para las muestras obtenidas: Antes y después de la amputación (muestras en proceso regenerativo).

### **Tinciones histológicas**

El material biológico obtenido se preparará con la finalidad de conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de

un microscopio fotónico. Para ello se llevarán a cabo las siguientes técnicas de tinciones histológicas:

**a) Técnica de Hematoxilina y Eosina (H&E).** Esta técnica consiste en utilizar hematoxilina para teñir estructuras ácidas como los núcleos celulares. Y eosina para teñir componentes básicos como el citoplasma (Alturkistani et al., 2015; Demircan et al., 2016). Los tiempos de tinción se estandarizarán de acuerdo al tipo de tejido proveniente del ajolote.

**b) Técnica tricrómica de Masson.** Con esta técnica se identifican fibras de colágeno y músculo liso. Se utilizan dos tipos de colorantes aniónicos para diferenciar: Núcleo, citoplasma y fibras de colágeno (Alturkistani et al., 2015; Demircan et al., 2016). Se determinarán los tiempos adecuados de tinción para cada muestra de los ajolotes.

### **Observación, captura y análisis de los cortes histológicos**

Los cortes se observarán y capturarán en un microscopio invertido de campo claro Zeiss (Axiovert 40 CFL), el cual contiene una cámara monocromática Axio Cam I y con la cual se capturarán diversas fotografías por medio del programa Zen de Zeiss que se encuentra en el Laboratorio de Biología Celular, para posteriormente analizarlas por medio de los programas libres Image J o Fiji.

### **Análisis transcriptómico por medio de RNA-seq**

Para el análisis de calidad de las muestras de la secuenciación de alto rendimiento, primero se realizará un pre-análisis o pre-procesamiento evaluando el control de calidad de lecturas crudas empleando las herramientas FastQC, FASTX-Toolkit y Trimmomatic con su filtrado respectivo. Posteriormente se realizará un alineamiento de lecturas por medio de STAR, empleando como genoma de referencia el publicado por Nowoshilow y colaboradores 2018. En caso de no poder emplear dicho genoma, se realizará un ensamblaje de novo mediante los algoritmos de BUSCO, CD-HIT-EST, transcoder. Una vez obtenidos los datos previos se realizará una cuantificación de niveles de expresión empleando las anotaciones previamente mencionadas. Posterior a ello, se harán los análisis de expresión diferencial, análisis de sobre-representación, el enriquecimiento funcional. Adicionalmente se realizará el análisis de

“splicing” alternativo empleando las herramientas de CuffDiff2 y DEXseq. Finalmente, evaluaremos cambios de expresión de elementos repetidos del genoma con TEtranscripts.

### **Instalaciones e infraestructura física para realizar el proyecto**

- CIBAC (UAM-Xochimilco, Instalaciones en Cuernavaca). Equipo, reactivos y alimento para mantener a los ajolotes.
- Laboratorio de Biología Celular (piso 8, UAM-Cuajimalpa). Equipo (microscopio Zeiss Axiovert 40 CFL equipado con la cámara AxioCam 1) y reactivos de laboratorio ubicados para realizar las tinciones histológicas.
- Anexo del Laboratorio de Biología Celular B2 (piso 2, UAM-Cuajimalpa). Equipo y reactivos de laboratorio para obtener cortes histológicos (crióstato), ubicado en el anexo del Laboratorio de Biología Celular B2.
- Unidad Biomédica en Cáncer (INCan), la unidad del INCan, cuenta con los espacios específicos para la extracción de ácidos nucleicos para secuenciación de alto rendimiento, por ello parte del material será procesado en esta unidad
- Los análisis del transcriptoma se harán en la UAM Cuajimalpa, en un servidor PowerEdge R740 que tiene 2x INTEL Xeon Gold 6230 (2.1 GhZ, 35.75 M cache 26c/52T). 2 GPUs NVIDIA quadro RTX 6000 Tiene 768 GB de Ram. 48 TB de disco duro.

### **Recursos Humanos**

2 alumnos de proyecto terminal de la Licenciatura en Biología Molecular.

1 alumno de posgrado (maestría).

### **Impacto esperado del proyecto**

Se espera que para realizar este proyecto se incorporen alumnos de licenciatura (proyectos terminales) y 1 de maestría, sin embargo se planea que para una fase posterior del mismo proyecto se incorpore 1 alumno de doctorado. A partir de los resultados obtenidos, en la última fase del proyecto se escribirá 1 artículo original para su potencial publicación en una revista indizada.

Adicionalmente, con este proyecto se pretende iniciar una investigación más profunda y detallada sobre los cambios que ocurren a nivel molecular durante el proceso regenerativo en dos regiones corporales diferentes del ajolote *A. mexicanum*. Es importante mencionar que con este proyecto se inicia una colaboración académica entre las unidades (Cuajimalpa-Xochimilco) en la UAM, así como con la Unidad Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

A su vez, de tener resultados positivos acerca de los genes y transcritos implicados en la regeneración del ajolote, podríamos tratar de explicar desde una perspectiva molecular los fenómenos de regeneración y envejecimiento celular. Este proyecto también podría impactar a mediano plazo en el área de medicina regenerativa y envejecimiento celular.

### **Recursos necesarios para el proyecto:**

#### **Financiamiento e infraestructura física y humana actual en el proyecto.**

Toda la infraestructura física y humana que se utilizará en este proyecto para el mantenimiento de los ajolotes y la toma de muestras biológicas, se encuentra en el CIBAC (Cuemanco) de la UAM-Xochimilco. El cual involucra material biológico, reactivos para anestesia, cirugías y alimento para los ajolotes.

Con respecto a la infraestructura física y humana necesaria para el procesamiento de las muestras biológicas y el análisis histológico, se llevará a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y el anexo del mismo, conocido como B2. El cual involucra lo siguiente:

- Material necesario para realizar la fijación de las muestras biológicas.
- Crióstato para realizar los cortes de las muestras biológicas.
- Material de laboratorio y reactivos necesarios para realizar las tinciones histológicas.
- Microscopio Zeiss Axiovert 40 CFL equipado con la cámara AxioCam 1, para la observación y captura de las imágenes de las muestras biológicas obtenidas.



### Fuentes de financiamiento externas.

Como fuente de financiamiento proviene del presupuesto que otorga el Depto. de Ciencias Naturales (DCN) a los profesores adscritos a dicho Depto. Sin embargo, se buscarán fuentes de financiamiento externas.

### Calendario de actividades

Actividades	Periodo I (12 meses)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Manejo de los ajolotes <i>A. mexicanum</i>												
Toma de muestras biológicas. Muestra de cola y mano de ajolotes de <i>A. mexicanum</i> de 3 jóvenes de 8 meses de edad												
Estandarización de las técnicas histológicas												
Observación, captura y análisis de los cortes histológicos												
Estandarización de extracción de ácidos nucleicos												
Análisis de los ácidos nucleicos												
Secuenciación de alto rendimiento												
Análisis transcriptómico por medio de RNA- seq de todas las muestras obtenidas												
<b>Periodo II (12 meses)</b>												
Toma de muestras biológicas. Muestra de cola y mano de ajolotes de <i>A. mexicanum</i> de 3 adultos de 24 meses de edad y 3 adultos de más de 4 años de edad												
Procesamiento histológico de las muestras biológicas: Tinciones por de cola y mano de los ajolotes												
Observación, captura y análisis de los cortes histológicos												
Extracción de muestras de ácidos nucleicos												
Secuenciación de alto rendimiento												
Análisis transcriptómico por medio de RNA- seq de todas las muestras obtenidas												
Escritura de 1 artículo original												

## Bibliografía

- 1) Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2015). Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global journal of health science*, 8(3), 72–79. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>
- 2) Bryant, S. V., Endo, T., & Gardiner, D. M. (2002). Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. *The International journal of developmental biology*, 46(7), 887–896.
- 3) CONABIO. (2011). Fichas de especies prioritarias. Ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*) Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.
- 4) Darnet, S., Dragalzew, A. C., Amaral, D. B., Sousa, J. F., Thompson, A. W., Cass, A. N., Lorena, J., Pires, E. S., Costa, C. M., Sousa, M. P., Fröbisch, N. B., Oliveira, G., Schneider, P. N., Davis, M. C., Braasch, I., & Schneider, I. (2019). Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(30), 15106–15115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900475116>
- 5) Demircan, T., İlhan, A. E., Aytürk, N., Yıldırım, B., Öztürk, G., & Keskin, İ. (2016). A histological atlas of the tissues and organs of neotenic and metamorphosed axolotl. *Acta histochemica*, 118(7), 746–759. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.07.006>
- 6) Farkas, J. E., & Monaghan, J. R. (2015). Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1290, 27–46. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2495-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2495-0_3)
- 7) Haas, B. J., & Whited, J. L. (2017). Advances in Decoding Axolotl Limb Regeneration. *Trends in genetics: TIG*, 33(8), 553–565. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.05.006>
- 8) Keinath, M. C., Timoshevskiy, V. A., Timoshevskaya, N. Y., Tsonis, P. A., Voss, S. R., & Smith, J. J. (2015). Initial characterization of the large genome of the salamander *Ambystoma mexicanum* using shotgun and laser capture chromosome sequencing. *Scientific reports*, 5, 16413. <https://doi.org/10.1038/srep16413>
- 9) Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H., & Tanaka, E. M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460(7251), 60–65. <https://doi.org/10.1038/nature08152>
- 10) McCusker, C., & Gardiner, D. M. (2011). The axolotl model for regeneration and aging research: a mini-review. *Gerontology*, 57(6), 565–571. <https://doi.org/10.1159/000323761>
- 11) McHedlishvili, L., Mazurov, V., Grassme, K. S., Goehler, K., Robl, B., Tazaki, A., Roensch, K., Duemmler, A., & Tanaka, E. M. (2012). Reconstitution of the central and peripheral nervous system during salamander tail regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America, 109(34), E2258–E2266.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1116738109>
- 12) Mena González Horacio, & Montes de Oca Kenia. (2014). Manual de Procedimientos para el Manejo y Mantenimiento de la Colonia de Axolotes del Laboratorio de Restauración Ecológica. *Biología*, 35. <https://doi.org/10.22201/ib.9786070258268p.2014>
  - 13) Monaghan, J. R., Athipposhy, A., Seifert, A. W., Putta, S., Stromberg, A. J., Maden, M., Gardiner, D. M., & Voss, S. R. (2012). Gene expression patterns specific to the regenerating limb of the Mexican axolotl. *Biology open*, 1(10), 937–948.  
<https://doi.org/10.1242/bio.20121594>
  - 14) Molina Vázquez A. (2010). El ajolote de Xochimilco. *Ciencias*, 98. 54-59
  - 15) Nowoshilow, S., Schloissnig, S., Fei, J. F., Dahl, A., Pang, A., Pippel, M., Winkler, S., Hastie, A. R., Young, G., Roscito, J. G., Falcon, F., Knapp, D., Powell, S., Cruz, A., Cao, H., Habermann, B., Hiller, M., Tanaka, E. M., & Myers, E. W. (2018). The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, 554(7690), 50–55.  
<https://doi.org/10.1038/nature25458>
  - 16) Nacu, E., Glausch, M., Le, H. Q., Damanik, F. F., Schuez, M., Knapp, D., Khattak, S., Richter, T., & Tanaka, E. M. (2013). Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl. *Development (Cambridge, England)*, 140(3), 513–518. <https://doi.org/10.1242/dev.081752>
  - 17) Nye, H. L., Cameron, J. A., Chernoff, E. A., & Stocum, D. L. (2003). Regeneration of the urodele limb: a review. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 226(2), 280–294. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10236>
  - 18) Sandoval-Guzmán, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., Tazaki, A., Joven, A., Tanaka, E. M., & Simon, A. (2014). Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell stem cell*, 14 (2), 174–187.
  - 19) Suetsugu-Maki, R., Maki, N., Nakamura, K., Sumanas, S., Zhu, J., Del Rio-Tsonis, K., & Tsonis, P. A. (2012). Lens regeneration in axolotl: new evidence of developmental plasticity. *BMC biology*, 10, 103. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-103>
  - 20) Tazaki, A., Tanaka, E. M., & Fei, J. F. (2017). Salamander spinal cord regeneration: The ultimate positive control in vertebrate spinal cord regeneration. *Developmental biology*, 432(1), 63–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.034>
  - 21) Vance E. (2017). Biology's beloved amphibian - the axolotl - is racing towards extinction. *Nature*, 551(7680), 286–289. <https://doi.org/10.1038/d41586-017-05921-w>

- 22) Vieira, W. A., Wells, K. M., & McCusker, C. D. (2020). Advancements to the Axolotl Model for Regeneration and Aging. *Gerontology*, 66(3), 212–222. <https://doi.org/10.1159/000504294>
- 23) Voss, S. R., Ponomareva, L. V., Dwaraka, V. B., Pardue, K. E., Baddar, N., Rodgers, A. K., Woodcock, M. R., Qiu, Q., Crowner, A., Blichmann, D., Khatri, S., & Thorson, J. S. (2019). HDAC Regulates Transcription at the Outset of Axolotl Tail Regeneration. *Scientific reports*, 9(1), 6751. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43230-6>
- 24) Wu, C. H., Huang, T. Y., Chen, B. S., Chiou, L. L., & Lee, H. S. (2015). Long-duration muscle dedifferentiation during limb regeneration in axolotls. *PloS one*, 10(2), e0116068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116068>
- 25) Zapata Gutiérrez, M. C., & Solís Juárez, L. G. (2014). Axolotl: El auténtico mounstruo del lago de Xochimilco. *Kuxulkab'*, 19(36). <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a19n36.336>