



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

LABORATORIO DE ANATOMÍA DE VERTEBRADOS Y
EDUCACIÓN CIENTÍFICA

Seguimiento del desarrollo embrionario y osteogénesis en *Ambystoma
mexicanum*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Cid Rivera Ixtlilpaktzin

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gabriela Sánchez Fabila



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
Desarrollo embrionario.....	10
Osteogénesis.....	10
ANTECEDENTES.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Obtención de organismos.....	16
Seguimiento del desarrollo embrionario: Tratamiento de muestras.....	18
Seguimiento del desarrollo óseo: Diafanización.....	19
Estimación de la tasa de crecimiento.....	20
Estandarización de la técnica de diafanización.....	20
Identificación de malformaciones dentro de la población.....	20
RESULTADOS	
Desarrollo embrionario.....	23
Seguimiento de desarrollo de tejido óseo.....	39
Tasa de crecimiento.....	55
Estandarización de la técnica.....	65
Malformaciones dentro de la población.....	70

DISCUSIÓN

Desarrollo embrionario.....73

Seguimiento de desarrollo de tejido óseo.....74

Tasa de crecimiento.....77

Estandarización de la técnica.....78

Malformaciones dentro de la población.....80

CONCLUSIONES.....82

LITERATURA CITADA83



AGRADECIMIENTOS

Me encuentro afortunada por haber recibido la oportunidad de conocer la vida en la escuela; Descubrí las maravillas del mundo en el que vivo y aprendí a convivir y ser cariñosa. Conocí la alegría entre mis amigos

Muestro mi gratitud por las enseñanzas y el cariño de la doctora Gabriela y el doctor Roberto al haberme recibido en el Laboratorio de Anatomía de Vertebrados y Educación Científica para guiarme con paciencia en mi Investigación

Mi madre quien siempre ha sido la responsable de la familia y mis hermanas siempre me acompañaron y guiaron con su experiencia. Y mi ser amado me brinda entusiasmo al ser mi inspiración y consuelo

...Yo soy esta vida misteriosa

En mí está lo eterno del universo al que voy a regresar.

RESUMEN

Ambystoma mexicanum es una especie mexicana endémica que habita en los canales de Xochimilco. Es utilizado como alimento y considerado una especie con cualidades curativas para la anemia, asma y la bronquitis; Además de ser parte de la cultura de la ciudad de México siendo conocido como un animal mítico desde la época prehispánica. El ajolote también tiene importancia en investigaciones científicas y médicas de laboratorio.

De una pareja ajolotes *Ambystoma mexicanum* se obtuvo una puesta de 526 huevos el 25 de agosto del 2018. Se recuperaron 3 huevos aleatoriamente cada ocho horas hasta la eclosión de las larvas; Los huevos fueron conservados en formol al .4% para ser observados al microscopio y descritos de acuerdo a literatura especializada. Se reportan 31 estadios que ilustran el desarrollo embrionario desde la fecundación de los huevos hasta la eclosión de alevines motiles a partir de sus caracteres anatómicos externos. Una vez que los alevines desarrollaron primordios de patas, además de haber alcanzado una talla promedio de 2 cm se recuperaron tres larvas aleatoriamente cada 5 días hasta abril del 2019. Se trataron de acuerdo a la técnica de Dawson modificada en dos concentraciones de alizarina: 0.2% para larvas de 2 a 5 cm de talla y 0.4% para larvas de 5 cm en adelante esto permitió dar seguimiento a la formación de tejido óseo, el esqueleto de *A. mexicanum* se compone de huesos que han madurado por dos procesos: Osificación intermembranosa y osificación endocondral. Las primeras estructuras en osificarse son los dientes seguidos de las piezas que componen el esplanocráneo y bóveda craneana en continuación de las extremidades anteriores mientras que las patas posteriores y la columna vertebral comparten ritmo de osificación, las últimas estructuras en aparecer son las costillas. El crecimiento se analizó con estadística paramétrica, ecuaciones de regresión alométrica para estimar estadios hipotéticos, y razones de proporción entre las estructuras corporales mostrando equilibrio entre el desarrollo de las extremidades anteriores y posteriores; El cráneo mantiene un 15% de tejido cartilaginoso correspondiente al aparato hipoidal que se conserva en el estadio



adulto. Al fin de la investigación todos los huesos largos y planos llegan a osificación primaria, las estructuras de articulación se mantienen cartilaginosas.

Las modificaciones implementadas en la técnica de diafanización en larvas y juveniles resulta confiable en un 94.26% sirviendo como referencia para próximas investigaciones. Finalmente, las malformaciones halladas tienen como causa principal factores genéticos asociados a la expresión de genes autosómicos.

Palabras clave: *Ambystoma*, *diafanización*, *desarrollo*, *embrionario*.

INTRODUCCIÓN

Recientemente *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder. 1798) conocido popularmente como ajolote de Xochimilco se volvió clave dentro de la herpetofauna mexicana como especie endémica. Su trascendencia histórica comienza desde los relatos mexicanos del dios Xolotl que negándose al sacrificio para los dioses, escapa de la muerte transformándose en ajolote. Forma parte como símbolo en la cultura contemporánea al aparecer en varias obras literarias, pinturas y hasta canciones; Actualmente el popular moderno lo adopto y transformo en figura animada cuya popularidad ha llegado hasta el otro lado del mundo en Japón (Bartra Roger. 2011).

La nombradía y curiosidad por los ajolotes se expandió gracias a la reproducción en cautiverio; Así desde su centro de origen en Xochimilco México llegaron por barco al museo de historia natural en Francia 34 organismos vivos en 1863, del museo se repartieron muestras hacia: Inglaterra, Irlanda, Holanda, Bélgica, Suiza, Rusia y Estados Unidos (Amstrong J.B., *et al.* 1989).

La caracterización y secuenciación de su genoma en 1990 (Whiteley M. 1990) fue parteaguas en la investigación biomédica, desde entonces numerosos estudios se han realizado con la intención de documentar principalmente los factores genéticos y sistemas celulares que los hacen capaz de regenerar algunos epitelios; Así como la pronta cicatrización y restablecimiento en tejido óseo. De igual forma la secuenciación genómica dio pauta a profundizar en la filogenia del grupo al que pertenece ayudando a establecer nuevas relaciones evolutivas entre los tetrápodos y vertebrados. Sumado a esto los eventos de mutagénesis dirigida también han sido analizados en *A. mexicanum*; Actualmente se pretende realizar investigaciones para el diseño terapéutico contra cáncer y Alzheimer.

Ambystoma mexicanum es un anfibio urodelo perteneciente a la familia Ambystomatidae y el género *Ambystoma*. En su estado silvestre son larvas



pedomorficas. Sin embargo en cautiverio la metamorfosis puede inducirse suministrando tiroxina (Casas G., *et al.* 2004).



Figura. 1 *Ambystoma mexicanum*, variedad silvestre. Organismo adulto macho.

La forma del cuerpo es típica del grupo, semejante a una lagartija alargada con cabeza ancha y cola aplanada lateralmente. La longitud promedio de la cabeza a la cola es de 23 cm, su peso varía de 60 a 110g en su estado adulto; La piel es lisa cubierta de mucosidad, en su estado adulto muestran doce pliegues costales a cada lado del cuerpo (Sefton., *et al.* 2015). Presenta un par de ojos redondos y pequeños sin párpados, el hocico es grande y tienen alrededor de 126 dientes maxilares y premaxilares, de 18 a 20 dientes vomero-palatinos ubicados adentro de la cavidad bucal, la lengua es retráctil (Majchrzak A. 2004). El sistema respiratorio consta de tres pares de branquias externas, cartilagosas y ramificadas colocadas detrás de la base de la cabeza, la respiración se realiza como un intercambio de gases a favor del gradiente: El oxígeno del agua pasa a los capilares, se distribuye a la sangre y el dióxido de carbono sale al agua, en la caja torácica se albergan pulmones que no participan en las funciones respiratorias (Frías-Alvarez., *et al.* 2010). Poseen un tracto gastrointestinal corto y simple. El alimento es ingerido por la boca, pasa al esófago que secreta moco con diversas enzimas digestivas para facilitar el transporte del alimento hacia el estómago. Los intestinos son cortos. Como órganos anexos al sistema digestivo se encuentran el hígado y el páncreas (Afful., *et al.* 2018). El hígado almacena

grasas y proteínas teniendo participación mínima en el procesamiento de nitrógeno el cual se libera en forma de amonio a través de la piel y por vía excretora de los riñones. Por otra parte el páncreas produce enzimas pancreáticas que intervienen en la digestión. Presenta un sistema circulatorio típico: El ventrículo impulsa la sangre hacia las branquias donde se oxigena y circula por arterias para repartirse por el cuerpo.

Las poblaciones nativas micro endémicas se encuentran en el sistema lacustre de de Xochimilco y el lago de Chalco al sur de la CDMX (L. Zambrano., *et al.* 2004). Como parte de un programa de recuperación del lago de Chapultepec en 2004 fueron encontrados algunos ejemplares adultos (Ceballos G., *et al.* 2005). En ambientes silvestres se alimentan de zooplancton, peces de talla menor que puedan capturar como charales, lombrices de agua y tierra, en cautiverio pueden obtener los nutrientes de: Croquetas especiales para tortugas, grillos, tubifex, artemias, tenebrios, filete de pescado y hasta pollo (Carrizo., *et al.* 2017).

Como parte de su conducta *A. mexicanum* se muestra solitario, carente de algún tipo de interacción más que el apareamiento (Comunicación personal: Mtra Arias-Balderas S. 2019).

En cuanto a su reproducción, *A. mexicanum* alcanza la madurez sexual aproximadamente un año después de su eclosión, se reproducen sexualmente por fecundación interna, no poseen órganos copuladores por lo tanto la hembra recoge el espermátforo que el macho ha depositado en el sedimento. Una hembra sana libera 400 a 500 huevos por puesta. Después de la fecundación los diferentes estadios pueden agruparse en tres periodos: Una primera etapa embrionaria (hasta la eclosión), etapa larvaria inicial, y un periodo juvenil hasta llegar a la madurez sexual. (Browne., *et al.* 2019).



DESARROLLO EMBRIONARIO

Después de la fecundación se inicia la etapa embrionaria que finaliza con la eclosión de alevines móviles cuyas características anatómicas y morfológicas se mantendrán durante todo su desarrollo ontogénico; Durante este periodo se han documentado 43 estadios de embriogénesis de crías en cautiverio con una duración total de 296hr. Los huevos depositados se encuentran envueltos por dos capas de vitelo. Del estadio 1 al 7 comienzan las divisiones celulares finalizando con la formación de las blastómeras, seguido por el establecimiento de la mórula, continuado por la blástula hasta llegar a 64 células. A partir del octavo estadio da inicio el proceso de gastrulación donde se forma el poro dorsal del blastoporo, y se diferencian las capas germinales. En el estadio 12 es posible observar el arquenteron formado. La neurulación se inicia en el estadio 13 desarrollando el sistema nervioso hasta el estadio 19, el cerebro se sigue formando hasta el estadio 23, el estadio 24 se caracteriza por formar el arco mandibular y la cabeza se endereza. De los estadios siguientes se describe la formación de órganos, emergencia de branquias, alargamiento de la cola y formación de la aleta. (Gilbert S. F. 2005).

OSTEOGÉNESIS

El cartílago hialino tiene su origen embrionario en el epiblasto; Del noveno estadio al iniciarse la gastrulación se diferencian en el mesodermo dorsal somático las células que se desarrollarán para dar lugar a otros tejidos como el cartílago, músculo, tejido óseo y la dermis dorsal (Shapiro F. & Forriol F. 2005).

La composición del cartílago hialino está basada en condroblastos rodeados por matriz extracelular. La condrogénesis se inicia tras la condensación de los condroblastos al aumentar la actividad hialuronidásica y síntesis de moléculas de adhesión celular, N-cadherina y la molécula de adhesión de células neurales (N-CAM); Las células mesenquimatosas precondrocíticas producen matriz extracelular rica en hialuronano y colágeno de tipo I, así como colágeno de tipo IIA

(van der Kraan PM., *et al.* 2009). El cartílago hialino crece intersticialmente y la dirección de crecimiento responde hacia donde esté dirigida la presión mecánica. Durante el desarrollo embrionario funciona como esqueleto dando soporte al cuerpo y participando en la locomoción (Echtermeyer F., *et al.* 2009).

Los condrocitos que conforman las placas de crecimiento epifisarias siguen su maduración hasta hipertrofia del condrocito donde se diferencia el colágeno tipo X, la apoptosis condrocítica da paso a la osificación endocondral (Wang M., *et al.* 2011). Los condrocitos se atrofian a causa de la expresión del factor de transcripción pax-1 y scleraxis, los procesos moleculares se inician por la adhesión de N-CAM y N-Cadherina que se agregan para formar condensados de células en proliferación, para iniciar la síntesis de matriz extracelular formada por colágeno tipo I y fibronectina. La matriz extracelular comienza a mineralizarse con cristales de hidroxapatita, la matriz extracelular se lisa quedando huecos donde se alojan las células osteoprogenitoras.



ANTECEDENTES

El estudio del desarrollo embrionario de *A. mexicanum* desde sus caracteres morfológicos externos no ha recibido atención necesaria en comparación con los estudios moleculares que están en apogeo. La descripción más destacada de es el texto clásico *Developmental-stage series of axolotl embryos. In Developmental Biology of the Axolotl* de 1989 donde se aborda el desarrollo embrionario y las características de la biología de la especie. Schreckenber y Jacobson en 1975 compara el tiempo para alcanzar cada etapa morfológica de *A. mexicanum* con *A. maculatum* y *Taricha torosa*. Clarke Samuel en 1879 nos muestra las etapas de desarrollo de otra especie de del género *Ambystoma*. Sin embargo, ningún estudio especifica si las muestras empleadas pertenecían a poblaciones silvestres o de cautiverio, así como las condiciones en las cuales se obtuvo la puesta y crianza de los embriones, impidiendo establecer patrones de semejanza o comparación entre los resultados.

Las investigaciones sobre los tejidos cartilaginoso y óseo de *A. mexicanum* se dirigen principalmente a documentar procesos a nivel molecular sobre los genes implicados en el desarrollo o regeneración: Iwata y su equipo en 2019 trabaja con organismos transgénicos para rastrear linajes celulares relacionados con el establecimiento de ejes corporales. Algunos otros como: Thygesen, Sibai y Voss con sus respectivos equipos de trabajo en 2019 mapean los genes implicados en la regeneración de extremidades de organismos transgénicos.

Los organismos genéticamente modificados como los generalmente empleados en los estudios difieren a los silvestres en plasticidad ecológica e influencia epigenética lo que impide una verdadera aplicación de los aprendizajes adquiridos a las poblaciones silvestres en riesgo (Comunicación personal Mtro: Correa-Sanchez. F. 2018).

Muchas han sido las indagaciones sobre los procesos moleculares que dirigen los eventos de regeneración; A pesar de ello las investigaciones destinadas a la morfología de *A. mexicanum* son insuficientes como referencia y guía en las investigaciones presentes y futuras. Las tesis: Descripción anatómica del sistema

óseo de *Ambystoma mexicanum* a través de la técnica de transparentación y Contribución al estudio del cráneo de *Ambystoma mexicanum* detallan la anatomía de organismos adultos no modificados genéticamente criados en condiciones de cautiverio.

Sin embargo, aún existe el vacío documental de los procesos de desarrollo del sistema óseo desde estadios larvales iniciales a estado adulto referido a todo el cuerpo.



JUSTIFICACIÓN

Diferentes ramas de la biología se han dado a la tarea de profundizar los estudios sobre *Ambystoma mexicanum* desde la genética hasta la ecología aportan información para la construcción del conocimiento de esta especie, así como el entendimiento de procesos evolutivos en los tetrápodos; Sin embargo, la morfología se ha quedado estática en las descripciones clásicas. Por ello el presente material, resultante de la investigación contribuye a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala con los estadios de embriogénesis de *A. mexicanum* de libre acceso.

Tras treinta años del último trabajo especializado en la morfología externa del desarrollo embrionario, resulta central actualizar la información de tal proceso, la presente importancia de *A. mexicanum* requiere detalles precisos sobre la biología de la especie para facilitar las futuras investigaciones. El estudio del desarrollo embrionario representa conocimiento fundamental para establecer comparaciones entre especies del mismo género y filo.

La técnica de diafanización, facilita identificar estadios representativos en la osteogénesis, manteniendo la estructura corporal sin alteraciones; Implicando menos costo monetario y tiempo de investigación comparado con técnicas histológicas o moleculares. Documentar el proceso ayudará a la integración de medidas para conservación y reintegración al ambiente silvestre de organismos criados en cautiverio; Mostrando indicadores morfológicos de madures fisiológica que tras su restitución permitan al organismo asegurar la supervivencia y reproducción.

OBJETIVOS

GENERAL: Dar seguimiento al desarrollo embrionario desde la puesta hasta la eclosión de alevines; Dar seguimiento a la osteogénesis desde la evidencia de tejido cartilaginoso hasta la osificación primaria en *Ambystoma mexicanum* desde sus caracteres anatómicos externos.

PARTICULARES:

- Seguimiento crecimiento de tejido óseo.
- Estandarización de la técnica de diafanización para larvas tempranas y larvas juveniles.
- Señalización de malformaciones dentro de la población desde sus caracteres anatómicos externos.



MATERIALES Y METODOS

OBTENCIÓN DE LOS ORGANISMOS

Los organismos fueron prestados por el ajolotario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala tras la revisión y aprobación del proyecto. Los organismos modificados con las técnicas empleadas fueron devueltos al término de la investigación. Todos los organismos que se encuentran bajo el resguardo del ajolotario proceden de donaciones de particulares; No pertenecen a poblaciones silvestres y se encuentran registrados en los inventarios del Laboratorio de Herpetología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

CONDICIONES GENERALES:

El ajolotario se encuentra acondicionado para dar estados óptimos a los organismos, cuenta con: Dos llaves de agua corriente, sistema de canaletas para desagüe, la temperatura se encuentra regulada a 18C° por tres chillers marca Hailea modelo Hs28A. Los organismos no son expuestos a ambientes exteriores ni luz solar, se encuentran libres de agentes toxicológicos y fúngicos.

Los organismos están resguárdalos individualmente en palanganas con 10L de agua (Tabla 1). Todos los contenedores están etiquetados con número de organismo y sexo.

Temperatura del agua	19°c
Amonio	>0.5 mg/l
Nitritos	>0.5 mg/l
Nitratos	>10 mg/l

Tabla 1. Valores de los parámetros físicos y químicos del agua usada por el ajolotario de la Facultad de Estudios superiores Iztacala.

ALIMENTACIÓN

Los embriones se nutren del vitelo hasta la eclosión. Los organismos son alimentados con la siguiente dieta

Lunes: Tubifex vivo (30g) por organismo	Miércoles: Charales crudos (30g) por organismo	Viernes: Filete de tilapia crudo (30g) por organismo
---	--	--

Tabla 2. Calendario de alimentación usada por el ajolotario de la Facultad de Estudios superiores Iztacala. El alimento es adquirido en el mercado de Mixhuca en la CDMX. Los charales y filete son suministrados mediante alimentación asistida con pinzas en trozos de .50cm de largo.



REPRODUCCIÓN

La reproducción se llevó a cabo conforme al manual de procedimientos: Manual básico para el cuidado en cautiverio del ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en las condiciones establecidas:

Reproductores: Macho #75 con talla 19.75 cm, peso 98.35 g. Hembra #123 con talla 20.08 cm, peso 102 g.

Temperatura del agua: 14°C regulada por un chiller marca Hailea modelo Hs28A.

Fotoperiodos: 14 hrs de oscuridad, 10 hrs luz regulados por lámparas LED marca Tamex modelo TLED8.

Sustrato: Los organismos se encontraron en una tinaja 50 L con agua (Tabla 1) contando con tiras de rafia para la ovoposición.

El 25 de agosto del 2018 se obtuvo una puesta de 526 huevos. Los huevos se resguardaron en la palangana hasta su eclosión a 14C°, se retiraron los huevos inviábiles y detenidos, se realizaron recambios de agua cada 2 días. Una vez eclosionados, los alevines fueron separadas en grupos de 4 alevines en contenedores de 1L de agua (Tabla 1) con recambio de agua cada 2 días. Una vez llegada la talla de 2cm las larvas fueron reubicadas individualmente en contenedores de 1L (Tabla 1).

Los alevines alimentaron con pulga de agua hasta alcanzar talla de 2 cm donde se alimentaron con tubifex (Tabla 2). Las larvas de 5 cm en adelante se alimentaron de acuerdo al calendario (Tabla 2).

SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Fueron seleccionados 3 huevos aleatoriamente cada ocho horas a fin de recuperar todos los estadios hasta su eclosión. Cada huevo se colocó en un frasco vial con 15ml de formol al .4%. Los huevos se midieron en longitud con vernier marca

Petrul modelo PET96, se pesaron sin capas vitelinas en balanza analítica marca GOLDENWALL modelo GOLD028.

En el Laboratorio de Anatomía de Vertebrados y Educación Científica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala los huevos fueron observados al microscopio estereoscópico marca Motic con número de serie #58346570 para identificar estructuras anatómicas que refieran cualquier estadio embrionario.

Los huevos se describieron de acuerdo literatura especializada: Gilbert, *Biología del desarrollo* y *Developmental-stage series of axolotl embryos. In Developmental Biology of the Axolotl.*

SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO ÓSEO: DIAFANIZACION

Para la diafanización se emplearon larvas desde los dos cm de talla. Se recolectaron 3 larvas aleatoriamente cada cinco días a fin de establecer intervalos de desarrollo. Las larvas se colocaron individualmente en frascos de vidrio que permitiera mantener el cuerpo extendido, fueron fijadas con formol al .4%. La piel y órganos fueron retirados. Se deshidrato el organismo en tren de alcoholes 40, 60, 80, 90, 96% dejando reposar cada hora por volumen. Los cartílagos se colorearon con azul de alcian: Al .5% en alcohol-ácido acético al .3% durante 24-48 hrs en oscuridad y temperatura ambiente. Las muestras se rehidrataron con tren de alcoholes 96, 90, 80, 60, 40%, agua dejando reposar cada hora por volumen. Los huesos se tiñeron con rojo de alizarina al .2% para larvas de 2 a 5 cm de talla y .4% para larvas desde los 5 cm de talla en solución de KOH al .2% en temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se conservan en glicerina al 60%. (Dawson A. B. A. 1926).

Con ayuda del programa motic usando el microscopio 4B con número de serie #485926 en el Laboratorio de Microscopia de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala fueron medidas las siguientes estructuras:

- Extremidades anteriores y posteriores.
- Huesos planos del carneo.



El proceso de osificación fue descrito de acuerdo diversos artículos científicos especializados en condrogénesis y osteogénesis.

SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO

El cálculo del ritmo de crecimiento de tejido cartilaginoso y óseo se llevó a cabo mediante estadística paramétrica, ecuaciones alométrica y sistema de proporciones de crecimiento.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Se utilizaron únicamente materiales, reactivos y soluciones nuevos descartando fallo de resultados a causa de materiales caducos; Se promedió el número de muestras que no respondieron a la técnica. Comparando los resultados con otras aplicaciones de la técnica

IDENTIFICACIÓN DE MALFORMACIONES DENTRO DE LA POBLACIÓN

Las malformaciones dentro de la población se identificaron observando todos los organismos de la población. Los hallazgos fueron reportados.

Las muestras fueron prestadas por el ajolotario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

- 170 huevos (Puesta 25 de agosto del 2019)

Huevos conservados en formol al .4%. Observados al estereoscópico, fotografiados y descritos; Señalando estructuras representativas a cada estadio su estadio.

Larvas: Tratadas de acuerdo a la técnica de diafanización (Dawson, A. B. A. 1926).

1-. Disección



2-. Deshidratación en tren de alcoholes: 40, 60, 80, 90, 96%



3-. Tinción de cartílago sumergiendo las muestras en solución azul de alcian al 0.5% en alcohol-ácido acético

3-. Rehidratación en tren de alcoholes: 96,90, 80, 60, 40% agua

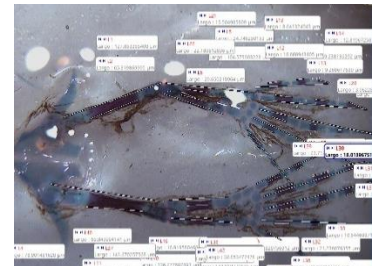
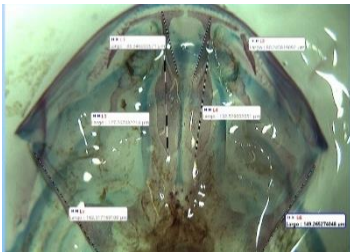
5-. Tinción de tejidos óseos con rojo de alizarina al 0.2% para larvas no mayores a 5 cm; 0.4% para juveniles y adultos en solución de KOH al 2%.



Los organismos se conservan en una solución de glicerina y alcohol.

En el Laboratorio de Microscopia de la Facultad de Estudios superiores Iztacala con el microscopio #1210379 y el programa Motic se realizó morfometría de las siguientes estructuras

- Cráneo
- Extremidades: Anteriores y posteriores



Para la estimación de la tasa de crecimiento se implementó estadística paramétrica, ecuaciones alométricas y sistema de proporciones

La estandarización de la técnica se logró con los hallazgos de muestras que no respondieron al tratamiento

Las malformaciones se identificaron revisando todos los organismos de las

RESULTADOS

Se describe la embriogénesis a partir de los caracteres anatómicos externos ampliando la descripción a los procesos morfogénicos y moleculares internos a fin de otorgar una plena comprensión.

1.0 SEGUIMIENTO DE DESARROLLO EMBRIONARIO.

Los huevos fueron fertilizados sexual e internamente, la anfinixis se completó y se depositaron en el sustrato, se encuentran envueltos por una capa previtelina conteniente de nutrientes como carbohidratos y diversas proteínas, rodeados por una capa más de vitelo laxo compuesto de agua que servirá para hidratar al embrión, además de protegerlo contra daños físicos e infecciones fúngicas. Las capas vitelinas reducen su tamaño con el proceso de desarrollo.

En los estadios 1 al 7, después de la activación del huevo, desde el polo animal comenzó la división celular de tipo holoblastica iniciada por el factor promotor de la mitosis (FPM) así, por mitosis consecutivas se concretaron 64 células dispuestas de forma radial moldeando la mórula. El estadio 8 se caracteriza por el fin de la segmentación y se reconoce como blástula precoz donde se ha formado la cavidad del blastocele por medio de la cavitación, distinguida por el cese en las divisiones mitóticas de las blastómeras del polo animal. El huevo no aumenta de tamaño a causa de los procesos internos en la detención de la mitosis en los estadios G1 y G2 en la blástula media. (Tabla 3, estadio 1-7).

Para el estadio 9 (Tabla 3) se han diferenciados notablemente los polos animal y vegetal donde en el polo animal, se acomoda el núcleo del cigoto y se desarrolla la actividad metabólica a mayor velocidad que en su contraparte, mientras el polo vegetativo acumula sustancias de reserva o vitelo.

La transición de la blástula media a la gástrula está regulada principalmente por la desmetilación de varios factores de transcripción como como la proteína VegT, la



función principal del proceso de gastrulación es la formación del mesodermo desde las profundidades del embrión, mientras que el ectodermo tiene su lugar en la profundidad media y el endodermo se originan sobre la superficie del embrión.

La gastrulación la encontramos en los estadios 10 al 12 (Tabla 3) Comienza su proceso con la formación de la línea primitiva, procedente del epiblasto que conforme se establecen los movimientos de extensión convérgete se elonga a través del embrión hasta su extremo caudal, en su extremo anterior se sitúa el nódulo de Hensen como un cúmulo celular cuyas funciones están relacionadas con la formación de la notocorda. Sobre el margen de los polos animal y vegetal de la blástula las células con sus movimientos logran cruzar a través de la línea primitiva adoptan una forma de botella, estrechando su superficie mientras se ensancha la parte basal y se hunden hacia el blastoceles, formando el arquenteron y el blastoporo en la superficie. Mediante la extensión convergente las células continúan ingresando mientras forman el intestino primitivo; Una vez dentro las células que se encuentran cerca del polo vegetal sufren involución así las células cercanas a la región que converge entre ectodermo y el endodermo darán origen al ectodermo faríngeo y la placa precordial mientras las células cerca del polo animal que atraviesan por epibolia y se encuentran hacia el labio dorsal del blastoporo (Tabla 3) y serán parte del cordamesodermo que formara la notocorda. La porción del polo animal que no involuciona, por medio de los movimientos de epibolia se expanden para cubrir la superficie del embrión.

Antes de terminar la gastrulación desde el mesodermo comienza la migración de un grupo de células que conformaran el mesodermo axial en dirección anterior a posterior hasta limitarse con la placa precordial; Por acción de protocadherina paraxial las células se separan del piso del mesodermo conformando la notocorda

Tras el reacomodo del blastocel se forma el tapón vitelino sobre el blastoporo (Tabla 3, estadios 10-10^{3/4}) con los movimientos continuos de involución sobre los labios ventrales del blastoporo se evidencian una hendidura considerable (Tabla 3, estadio 11) Consecuentemente el labio dorsal del blastoporo se sitúa del lado ventral, y las células mesodérmicas que ingresen desde esta región darán lugar a

las somitas. Tras este proceso el futuro endodermo se encuentra internalizado en el embrión, el próximo ectodermo se encuentra rodeando al embrión dejando en la parte intermedia al mesodermo.

Es importante señalar procesos celulares dentro de la segmentación y gastrulación que, aunque no son visibles desde la anatomía externa del embrión son fundamentales durante la embriogénesis: Las células vegetales de la región dorsal de la blástula por acción de β -catenina dan origen al centro de Nieuwkoop, así mismo las células que corresponden al endodermo faríngeo y labio dorsal del blastoporo conforman el organizador de Spemann que guarda relación con el destino de algunos tejidos futuros. El centro de Nieuwkoop junto con el organizador de Spemann mediante la acción de diversos factores transcripcionales del tipo VegT, proteínas tales como Nodal y genes como Brachyury, Xbra determinan los ejes corporales del organismo

De los estadios 13 al 20 (Tabla 3) los huevos experimentan neurulación, proceso que se divide en dos estadios: Primaria y secundaria. En la neurulación primaria la formación de la placa neural y la aparición del surco neural; En la neurulación secundaria se forma el tubo neural.

La neurulación primaria se inicia con la formación y moldeado de la placa neural: Se inicia con el elongamiento de las células pertenecientes al ectodermo en la región del ectodermo faríngeo que junto con movimientos intrínsecos hace que se reorganicen por encima de este, así queda conformada la placa neural, una vez conformada los bordes remanentes aumentan de grosor y se invaginan (Tabla 3, estadio 15) constituyendo un canal o surco entre estos dos a todo lo largo del embrión formando así los lados izquierdo y derecho en el embrión. Hecho el surco neural se establecen secciones bisagra donde se conectan la placa neural con el endodermo faríngeo que ha quedado por debajo de esta, anclándose a la notocorda. Los pliegues neurales se fusionan entre si (Tabla 3, estadio 19). Por acción de cadherina-N y N-CAM el tubo neural se separa del ectodermo superficial. Desde el centro de la notocorda se va cerrando el tubo neural hacia los extremos del embrión.



Establecida la notocorda y el tubo neural se distinguen los ejes dorso-ventral y anteroposterior.

La neurulación secundaria tiene como propósito la formación del cordón medular situado por debajo del ectodermo superficial; El tubo neural sobresale moldeando las cámaras anteriores del cerebro y la medula espinal (Tabla 3, estadio 20). En cuanto a la porción dorsoventral, desde la región más dorsal del tubo neural se formarán las células del sistema nervioso

La somitogénesis se inicia terminada la neurulación (Tabla 3) Derivado del mesodermo paraxial mediante la acción de la proteína Nogina se separan las somitas como unidades celulares independientes en forma de espiral recubiertas de epitelio. Desde la porción anterior al tronco aparece el primer par de somitas. Los genes Notch están implicados en la velocidad de formación somítica. Las somitas darán origen a diversas estructuras según la expresión de los genes Hox, ejemplo de ello es la porción ventral de la somita con la capacidad de especificar el origen de cartílago es llamada esclerotoma (1.1 Seguimiento de la osificación).

A partir del estadio 20 (Tabla 3) los embriones comienzan a reformarse adoptando una estructura alargada. Derivado de la cresta neural craneal se obtienen la mesénquima craneofacial del que se diferencia: Cartílago, hueso, así como tejidos conectivos del rostro. Las células de la cresta neural craneal viajan e ingresan a los arcos faríngeos, las células que han viajado desde la rombomera 1 ingresa en el primer arco faríngeo para formar el arco mandibular (Tabla 3) y los futuros huesos de la cara (Tabla 4).

La organogénesis se aprecia desde el estadio 17 con la evidencia de la región pronéfrica derivada del mesodermo intermedio y sus interacciones con el mesodermo paraxial y Pax2 y Pax8. El corazón se forma tras la especificación de células que han migrado desde la línea primitiva a la lámina del mesodermo lateral donde bajo la acción de BMP y FGF se diferencian a células cardíacas. Desde el endodermo se forman el tubo digestivo regulado por cSox2 y el tubo respiratorio derivados del intestino primitivo.

A partir de los estadios 20 al 31 el embrión crece en talla, forma la aleta dorsal y el pigmento de piel se hace evidente. En el estadio 25 emergen los filamentos externos de las branquias. Hacia el final de la embriogénesis *A. mexicanum* se encuentra completamente formado, las capas de vitelinas se han reducido para dejar emerger a la larva motil carente de extremidades que se formarán en la etapa de larva inicial (1.1 Seguimiento de la osificación). Las características corporales se mantendrán durante toda la vida del organismo.





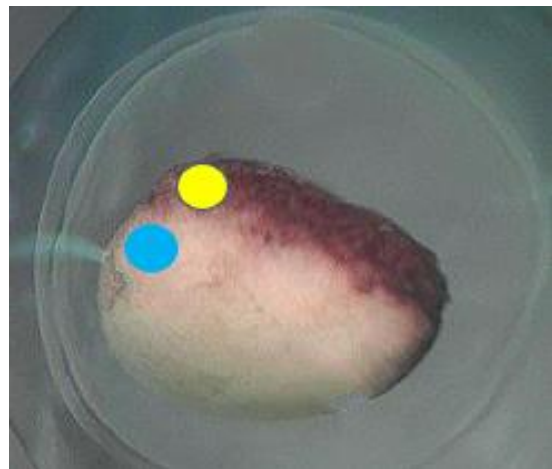
Organismos progenitores. A) Macho. Talla 19.75 cm. Peso 98.35 g. B) Hembra. Talla 20.08 cm. Peso 102 g. 10 de agosto del 2018.



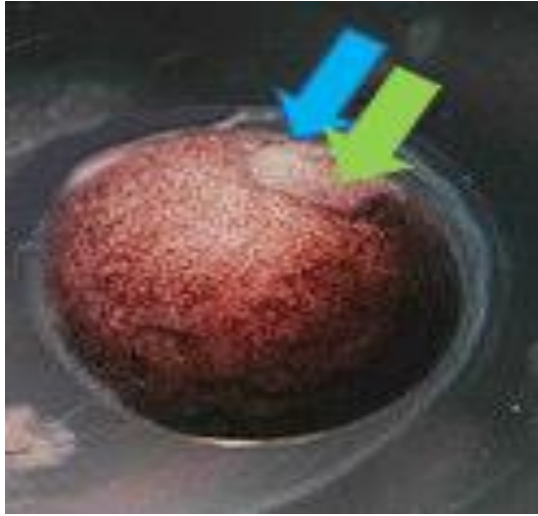
Puesta de 526 huevos del 25 de agosto del 2018. Huevos depositados sobre rafia, sumergidos en 50 L de agua. Mantenido en condiciones de cautiverio.



Estadio: 1-8 Mórula.
Tiempo desde la fecundación: \approx 16H.
Vista dorsal. 4 X



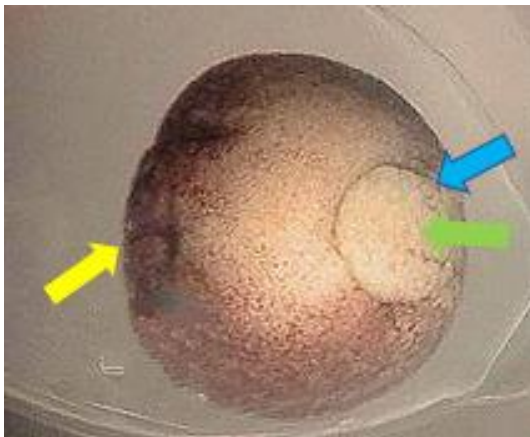
Estadio: 9 Polo animal (amarillo), polo vegetal (azul).
Tiempo desde la fecundación: \approx 21 H.
Vista dorsal. 4 X



Estadio: 10 Gástrula primaria, blastoporo (azul), tapón vitelino (verde).
Tiempo desde la fecundación: \approx 26 H.
Vista dorsal. 4 X



Estadio: 10 $\frac{1}{2}$ Blastoporo (azul), tapón vitelino (verde), labio dorsal del blastoporo (amarillo).
Tiempo desde la fecundación: \approx 32 H.
Vista dorsal. 4 X

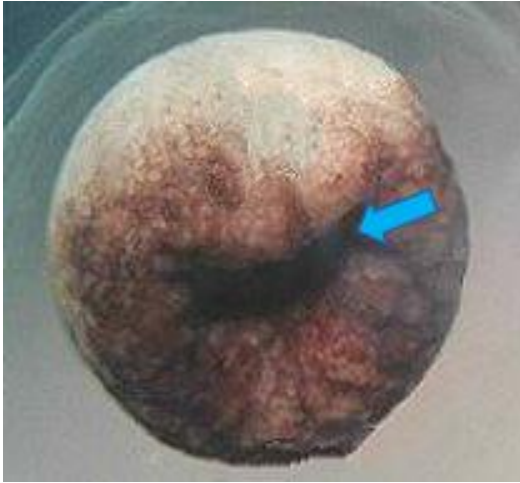


Estadio: 10 $\frac{3}{4}$ Blastoporo (azul) tapón vitelino (verde) labio dorsal del blastoporo (amarillo).
Tiempo desde la fecundación: \approx 37H.
Vista dorsal. 4 X

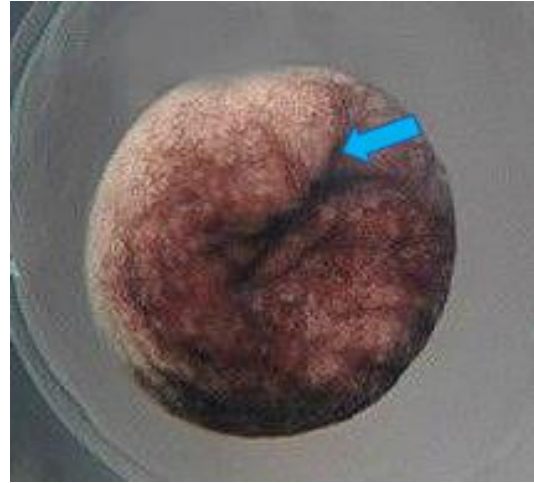


Estadio: 11 Labios ventrales (azul).
Tiempo desde la fecundación: \approx 38 H.
Vista dorsal. 4 X





Estadio: 11 ½ Labios ventrales (azul).
Tiempo desde la fecundación: ≈ 40 H.
Vista dorsal. 4 X



Estadio: 12 Labios ventrales (azul).
Tiempo desde la fecundación: ≈ 40 H.
Vista dorsal. 4 X



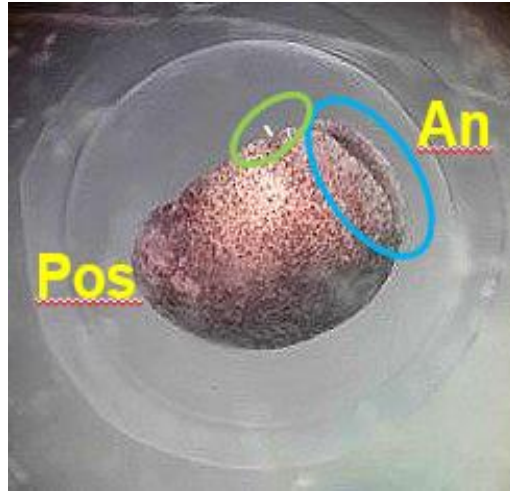
Estadio: 13 Néurula primaria. Labios ventrales (azul).
Tiempo desde la fecundación: ≈ 50 H.
Vista dorsal. 4 X



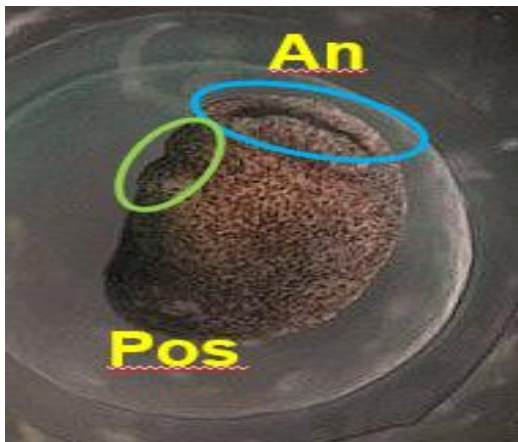
Estadio: 14 Néurula primaria. Labios ventrales (azul).
Tiempo desde la fecundación: ≈ 58 H.
Vista dorsal. 4 X



Estadio: 15
Delimitación de crestas neurales (azul).
Tiempo desde la fecundación: \approx 59-63 H.
Vista dorsal. 4 X



Estadio: 16
Elevación de crestas neurales (azul), surco hiomandibular (verde). Delimitación de eje anterior y posterior.
Tiempo desde la fecundación: \approx 64 H.
Vista dorsal. 4 X

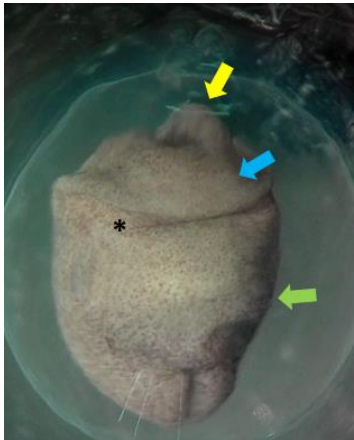


Estadio: 17 Elevación de crestas neurales (azul) Surco hiomandibular (verde). Delimitación de eje anterior y posterior.
Tiempo desde la fecundación: \approx 66 H.
Vista dorsal. 4 X



Estadio: 18 Tubo neural (verde). Delimitación de eje anterior y posterior.
Tiempo desde la fecundación: \approx 69 H.
Vista dorsal. 4 X

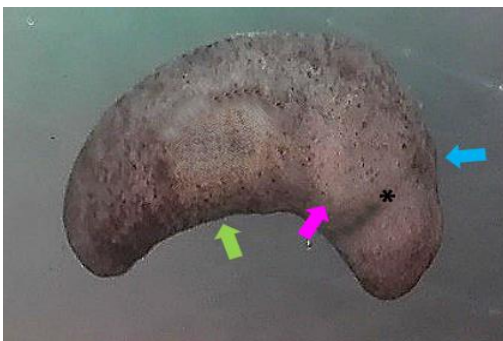




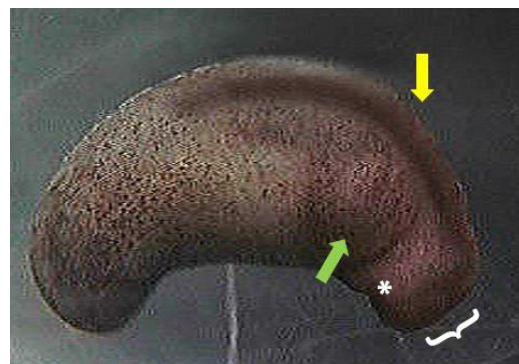
Estadio: 19
Pliegues neurales fusionados (amarillo), prominencias occipitales y parietales (azul), surco hiomandibular (*), pronefros evidente (verde).
Tiempo desde la fecundación: \approx 70-73 H.
Vista dorsal. 4 X



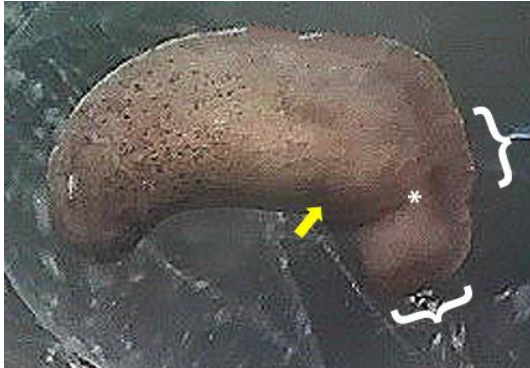
Estadio: 20
Pliegues neurales fusionados (azul), prominencias occipitales y parietales (verde), zona branquial (amarillo), surco hiomandibular (*) pronefros evidente (rosa) elongamiento de la cola (morado).
Tiempo desde la fecundación: \approx 80 H.
Vista dorsal. 4 X



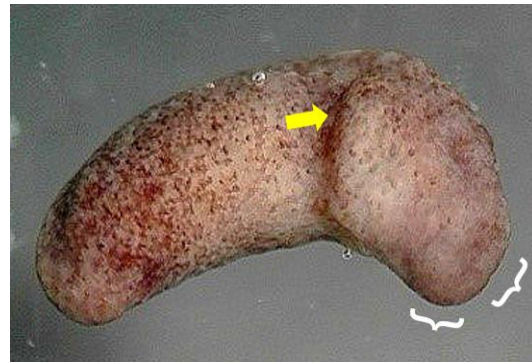
Estadio: 21
Columna vertebral (azul), zona branquial (rosa), surco hiomandibular (*) pronefros evidente (verde).
Tiempo desde la fecundación: \approx 92 H.
Vista dorsal. 4 X



Estadio: 22
Columna vertebral (amarillo), zona branquial (verde), surco hiomandibular (*) porción rostral (}).
Tiempo desde la fecundación: \approx 100 H.
Vista dorsal. 4 X

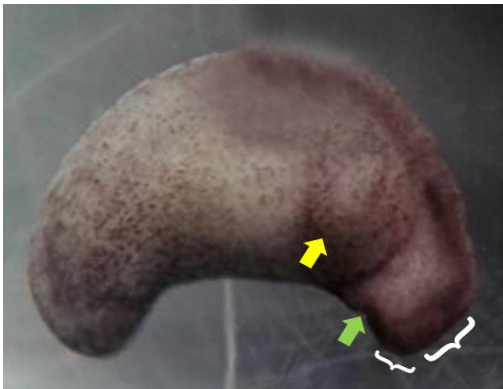


Estadio: 23
Zona branquial (amarillo),
surcohiomandibular (*), porción rostral y
craneal (}) la cabeza muestra su grado
máximo de inclinación.
Tiempo desde la fecundación: ≈ 80 H.
Vista dorsal. 4 X



Estadio: 24
Zona branquial masprimente (amarillo),
surco hiomandibular (*), porción rostral y
craneal (}) El cuerpo comienza a
enderezarse.
Tiempo desde la fecundación: ≈ 80 H.
Vista dorsal. 4 X

23



Estadio: 25
Zona branquial (amarillo), Hiomandibular
(verde) porción rostral y craneal (}) El
cuerpo comienza a enderezarse.
Tiempo desde la fecundación: ≈ 110 H.
Vista dorsal. 4 X

24



Estadio: 26
Elongacion de la aleta (amarillo)
zona branquial (verde), Hiomandibular
(azul) porción craneal (}) El cuerpo
queda erguido.
Tiempo desde la fecundación: ≈ 120 H.
Vista dorsal. 4 X



25



Estadio: 27
Brote de los pares branquiales (amarillo) porción torácica donde se aloja el corazón (rojo) bulbo ofaltivo (rosa).
Tiempo desde la fecundación: \approx 125 H.
Vista dorsal. 4 X

26



Estadio: 28
Elongamiento de la aleta (amarillo) Crecimiento de filamentos branquiales (azul), porción rostral y craneal (}).
Tiempo desde la fecundación: \approx 177 H.
Vista dorsal. 4 X

27



Estadio: 29
Crecimiento de aleta a lo largo del cuerpo (rosa) (crecimiento de filamentos branquiales (amarillo) Hiomandibular (verde) porción rostral y creaneal (}) el ojo es distinguible (rojo)
Tiempo desde la fecundación: \approx 220 H.
Vista dorsal. 4 X

28



Estadio: 30
Crecimiento de aleta a lo largo del cuerpo (rosa) (crecimiento de filamentos branquiales (amarillo) Hiomandibular (verde) porción rostral y creaneal (}) el ojo es distinguible (rojo)
Tiempo desde la fecundación: \approx 265 H.
Vista dorsal. 4 X

29



Estadio 31

Larva recién eclosionada
Cráneo (amarillo) ojo (azul), branquias (verde) cuerpo (azul)
Tiempo desde la fecundación: \approx 330 H.
Vista dorsal. 3 X

Tabla 3. Estadios embrionarios de *Ambystoma mexicanun*. 31 estadios que muestran la segmentación, neurulación, gastrulación y organogénesis



Muestra	Peso aproximado por tres repeticiones	Talla aproximada por tres repeticiones
Estadio #1	-	-
Estadio #2	-	-
Estadio #3	-	-
Estadio #4	-	-
Estadio #5	-	-
Estadio #6	-	-
Estadio #7	-	-
Estadio #8	0.28 gramos	2 milímetros
Estadio #9	0.29 gramos	2 milímetros
Estadio #10	0.31 gramos	2 milímetros
Estadio #10 $\frac{1}{2}$	0.32 gramos	2 milímetros
Estadio #10 $\frac{3}{4}$	0.35 gramos	2 milímetros
Estadio #11	0.38 gramos	2 milímetros
Estadio #11 $\frac{1}{2}$	0.38 gramos	2 milímetros
Estadio #12	0.39 gramos	2 milímetros
Estadio #13	0.41 gramos	2 milímetros
Estadio #14	0.41 gramos	2 milímetros
Estadio #15	0.42 gramos	3 milímetros
Estadio #16	0.44 gramos	3 milímetros
Estadio #17	0.45 gramos	3 milímetros
Estadio #18	0.47 gramos	3 milímetros
Estadio #19	0.49 gramos	3 milímetros
Estadio #20	0.57 gramos	4 milímetros
Estadio #21	0.60 gramos	4 milímetros
Estadio #22	0.63 gramos	4 milímetros
Estadio #23	0.75 gramos	5 milímetros
Estadio #24	0.79 gramos	5 milímetros

Estadio #25	0.85 gramos	6 milímetros
Estadio #26	0.93 gramos	6 milímetros
Estadio #27	0.98 gramos	7 milímetros
Estadio #28	1.20 gramos	7 milímetros
Estadio #29	1.5 gramos	8 milímetros
Estadio #30	1.9 gramos	1 cm
Estadio #31	2.5 gramos	1.5 cm

Tabla 4. Promedio de peso y talla de tres repeticiones empleadas por cada estadio. Muestran crecimiento lineal.



1.1 SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO ÓSEO

Se describe la formación de tejido óseo a partir de los caracteres anatómicos externos ampliando la descripción a los procesos morfogénicos y moleculares internos a fin de otorgar una plena comprensión.

Desde su estado embrionario se comienza a preparar el sistema esquelético. Las distintas estructuras que lo componen derivan tres linajes primordiales: El tejido cartilaginoso y óseo tiene su origen en las células de la cresta neural craneal, el esqueleto axial se desarrolla de las células somíticas, por su parte el esqueleto apendicular se origina del mesodermo lateral,

A partir de septiembre del 2018 a abril del 2019 se observó la transición de tejido cartilaginoso en tejido óseo por tres procesos:

- Osificación intermembranosa en piezas de esplancocraneo y bóveda craneana.
- Osificación endocondrala para el desarrollo de dientes, huesos largos y vertebras.
- Capsulas óticas presentan proceso mixto.

Las primeras estructuras en evidenciarse fueron los arcos branquiales pertenecientes al condocraneo (Tabla 5, estadio 1) se constituyen por cartílago hialino no articular.

Los principales elementos que componen el cartílago son: Condrocitos, Colágeno tipo II, Condroitina y Ácido hialurónico; Las células derivadas de la mesénquima del esclerotoma y mesénquima facial por acción del de Pax1 y Scleraxis se diferencian a condrocitos. Los condrocitos se agrupan en oquedades llamadas lagunas, cada condrocito está rodeado por una capa de matriz extracelular, este conjunto se denomina condroma, el condroma esta revestido por pericondrio compuesto a su vez por dos capas: La interna formada por células condrogenas que se diferencian en condroblastos y una externa con abundantes fibras colágenas, fibroblastos y fibrocitos. El cartílago crece por dos mecanismos: Aposicionalmente desde la capa interna del pericondrio encargada de producir

nuevas capas de cartílago por proliferación de las células mesenquimatosas, el cartílago crece hacia el exterior por aposición de capas sucesivas e intersticialmente cuando los condrocitos se agrupan en grupos isógenos que forman laminas.

Los dientes y mandíbulas son las primeras piezas en calcificarse (Tabla 5, estadio 2). Las piezas dentales provienen de células ectomesenquimáticas derivadas de la cresta neural diferenciadas a odontoblastos por acción de FGF8 y proteínas BMP4 que inducen la formación de papila dental posteriormente odontoblastos tras la acción de FGF3, BMP3, HGF maduran y producen dentina; Seguido de esto aparecen los ameloblastos derivado del epitelio de la mandíbula para formar esmalte por acción de tenascina y fosfatasa alcalina para completar la formación del diente

Por su parte las mandíbulas se transforman por osificación endocondral que se divide en cinco estadios comenzando con la preparación de un molde de cartílago hialino (Figuras 2 y 3).

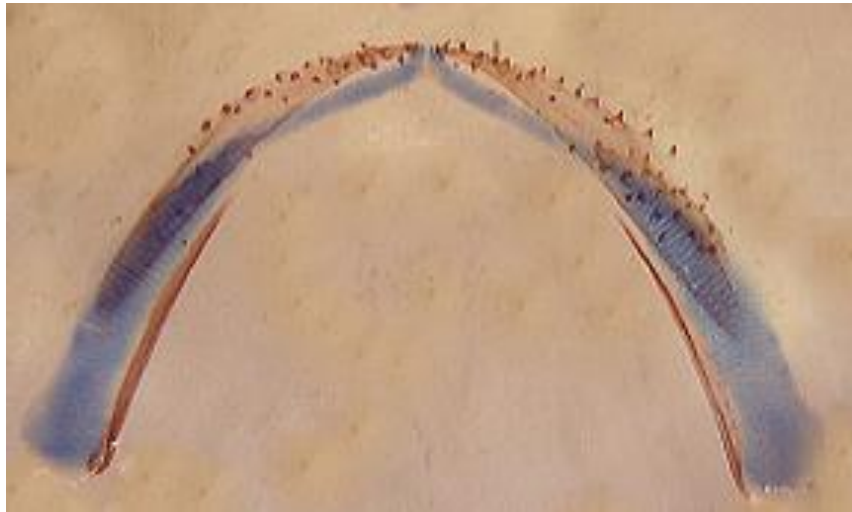


Figura 2. Mandíbula en doble tinción. Vista dorsal 4X. Atraviesa proceso de osificación endocondral, molde cartilaginoso teñido con azul de alcian y estructuras en calcificación teñidas de rojo de alizarina.





Figura. 3. Porción caudal y sacra de columna vertebral en doble tinción. Vista dorsal 4X. Atraviesa proceso de osificación endocondral, molde cartilaginoso teñido con azul de alcian y estructuras en calcificación teñidas de rojo de alizarina.

Seguido de eso las células mesenquimáticas se agrupan en paquetes y se diferencian a condrocitos, los condrocitos crecen hasta que algunos de ellos revientan liberando citoplasma, colágeno X y fibrotecnina que altera el pH de la matriz favoreciendo la formación de carbonato de calcio, además la activación del factor de angiogénesis VEGF que propicia aparición de vasos sanguíneos. Otros condrocitos del cartílago mueren por apoptosis por falta de nutrientes a causa del cambio de respiración aeróbica por anaerobia, formando cavidades pequeñas; Los vasos sanguíneos inmersos en el molde de cartílago favorecen la diferenciación de las células del periostio en osteoblastos. De la diáfisis se forma una lámina delgada de hueso compacto, llamada collar óseo (Figura 4.)



Fig. 4. Formación del collar óseo. Vista ventral 4X de fémur derecho. Muestra adelgazamiento en la diáfisis (verde) y calcificación progresiva del periostio (amarillo)

La sustitución de condrocitos por osteoblastos depende de los factores promotores de mineralización, en el proceso la acción de VEGF favorece la aparición de condroclastos que absorben los restos de condrocitos apoptóticos. Tras la

formación de tejido óseo desde el pericondrio se condensa la capa del periostio. Con el crecimiento del molde cartilaginoso se induce el desarrollo del centro de osificación primario, donde el tejido óseo sustituye la mayor parte del cartílago (Figura 5).



Figura 5. Sustitución progresiva de tejido cartilaginoso por óseo. Vista ventral 4X. Carpos y metatarsos de pata posterior derecha.

Seguido de eso los osteoblastos depositan matriz ósea sobre el cartílago calcificado, formando las trabéculas del hueso esponjoso. Con el elongamiento del centro de osificación los osteoclastos ingresan al hueso desde los vasos sanguíneos destruyendo las trabéculas formando la cavidad medular, que llena después con médula ósea roja.



A partir de septiembre del 2018 comienzan a evidenciarse las estructuras del esplacnocraneo y bóveda craneana (Tabla 5, estadio 3) que han osificado a partir de osificación intermembranosa (Figura 6) ocurre dentro de una membrana embrionaria de tejido conjuntivo. Las células mesenquimales derivadas de la cresta neural se nutren por irrigación sanguínea, se replican y agrupan formando una estructura llamada nódulo, las células comienzan a producir matriz extracelular rica en colágeno tipo 1, simultáneamente las células mesenquimáticas por la acción de CBFAl y diversas proteínas osteogénicas como BMP2, BMP4, BMP7 se transforman en osteoblastos desde la periferia del nódulo al centro de este. Tras estos cambios los nuevos osteoblastos comienzan a formar matriz extracelular rica en proteoglicanos favoreciendo la polimerización de colágeno, formando microfibrillas. Mediante la acción proteica se condensa condroitín sulfato y queratán sulfato facilitando la precipitación de sales de fosfato de calcio que constituyen la parte mineral de la matriz ósea. Las acumulaciones de matriz ósea forman estructuras alargadas llamadas espículas, las espículas se agregan formando una estructura en forma de red, dando lugar a las trabéculas. Sobre la red trabecular se forma el periostio y en el interior de los espacios trabeculares se forma médula ósea y endostio.



Figura 6. Formación de tejido óseo por proceso de osificación intermembranosa. Vista ventral 4X. Membranas complementan su proceso (amarillo) .

En el mes de septiembre del 2018 observamos la formación de extremidades, comenzando con las extremidades anteriores (Tabla 5 estadio 4).

Desde su estadio embrionario se preparan los patrones que darán origen a las extremidades en sus ejes proximal-distal regulados por FGF, eje anteroposterior coordinado las proteínas Sonic hedgehog y el eje dorsoventral dirigido por Wnt7a.

Las células mesenquimáticas del mesodermo lateral y el miotoma proliferan y se acumulan bajo el ectodermo, creando un bulto llamado campo de la extremidad. mediante la función de FGF10 se da inicio a la formación de la cresta apical ectodérmica que se encargara de controlar el crecimiento de la extremidad desde su zona de progreso; La especificación de miembros anteriores y posteriores está regulada por los factores de transcripción Tbx5 para los anteriores y Tbx4 para los posteriores, la polaridad proximodistal es mediada por genes de la familia Hoxd desde la zona de actividad polarizante, además del número de divisiones mitóticas que tengan dentro de la zona de progreso: Las primeras células que se liberan de la zona de progreso se convertirán en humero/fémur y expresan los genes Hoxd-9 y Hoxd-10 mientras que las ultimas células formaran los carpos y tarsos donde se encuentran los genes Hoxd-13.

La formación de los dígitos es liderada por el mesodermo unterdigital, que se encargara de eliminar las membranas interdigitales para liberar cada dedo. Las proteínas BMP2 y BMP7 ayudan a especificar cada dedo. Para terminar la formación de la extremidad el ectodermo que lo recubre determinara la polaridad dorsoventral controlada por las proteínas Wnt7a, donde se encuentra la activación del gen Lmx1 en el eje ventral. Finalmente, tras la acción del ácido retinoico se produce la evaginación del esbozo de la próxima extremidad

La formación de capsulas óticas (Figura 7) inicia desde su porción rostral hacia la central, con un molde de cartílago. A partir de la región occipital se comienza a calcificar intermembranosamente (Figura 8) combinando ambos procesos en su formación.



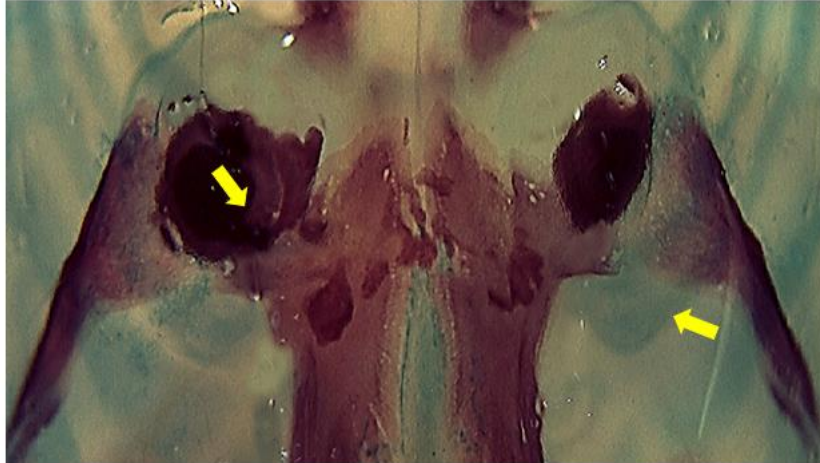
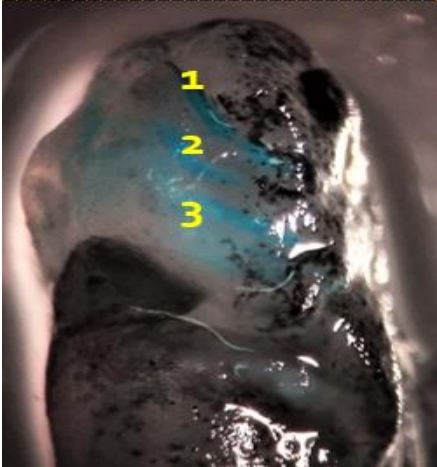
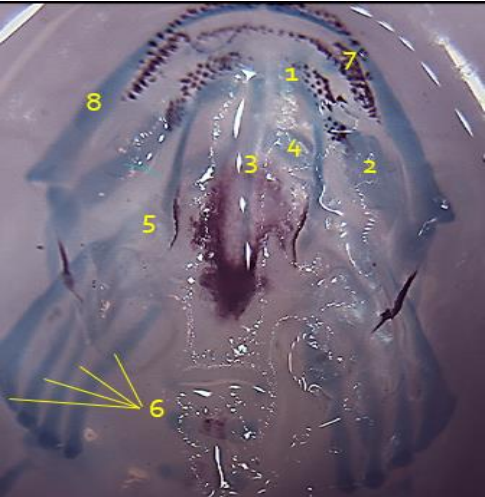
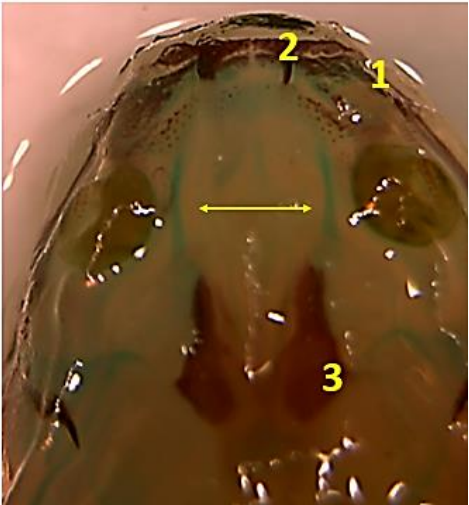


Figura. 8. cápsulas óticas. El estado cartilaginoso de la región más frontal prevalece después de finalizar la osificación de la parte central







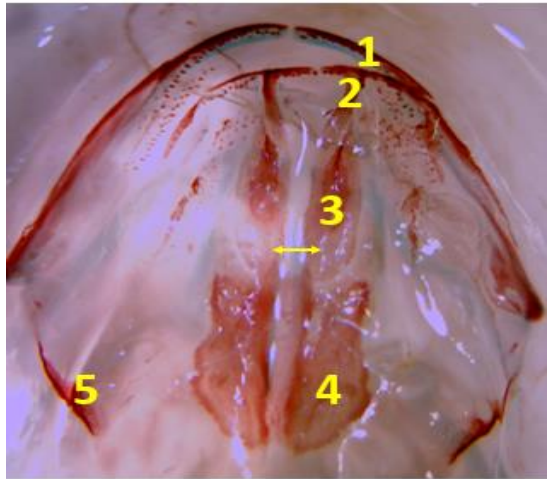
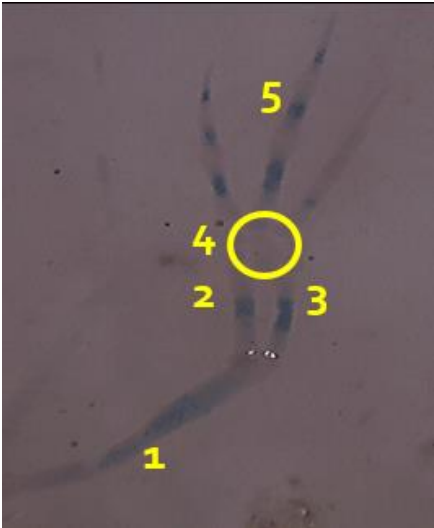
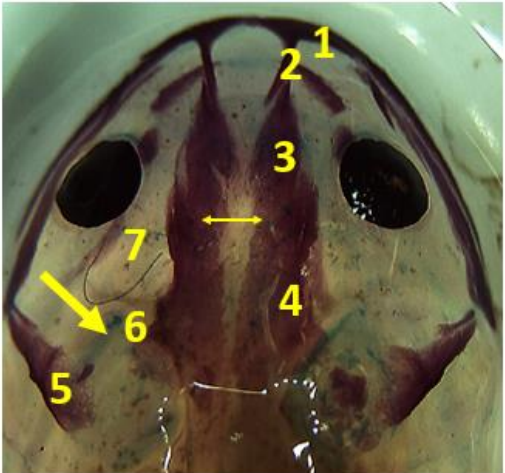
Figura. 7. Formación de cartílago en capsulas óticas. El proceso inicia desde la periferia al centro. La osificación se presenta de forma inversa; del centro a la periferia

A continuación, se muestran los estadios identificados en la formación de tejido óseo y consolidación del sistema esquelético de *A. mexicanum*.

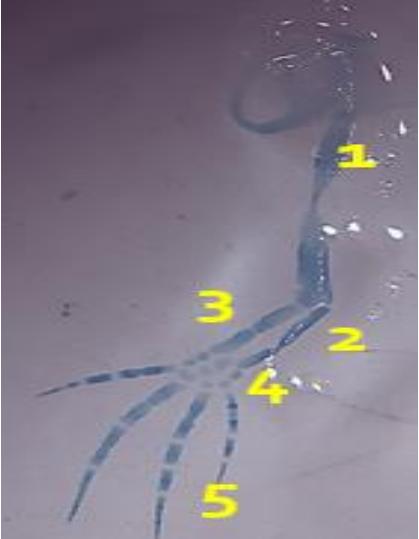
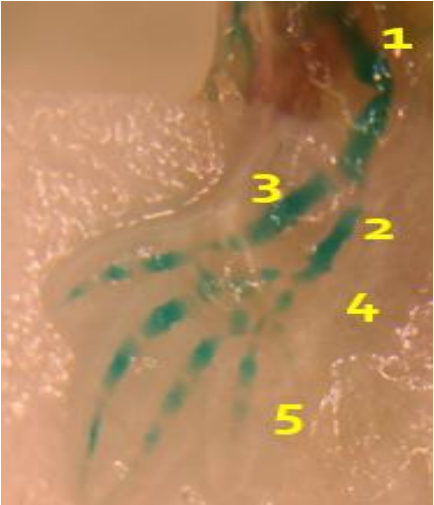

	<p>Estadio: 1</p> <p>Arcos branquiales teñidos de azul. Vista lateral izquierda 4x.</p> <p>Formación de tres pares de arcos branquiales (1, 2, 3)</p>
	<p>Estadio: 2</p> <p>Aparato hioideo tenido de azul. Vista ventral 4X.</p> <p>1- Hipohial, 2- Ceratohial, 3-Basihial, 4-Epihial, 5- Hipobranquial, 6-Ceratobranquial, 7- Dientes (Osificadas), 8- Dentales (Cartilaginosa)</p>
	<p>Estadio: 3</p> <p>Estructuras craneales teñidas de rojo. Vista dorsal 4X.</p> <p>1-Dentales, 2- Premaxilar , 3-Parietal ↔ Apertura de la fenestra craneal</p>



	<p>Estadio: 4</p> <p>Botón de pata anterior derecha sin teñir. Vista lateral 4X.</p> <p>Evaginación de extremidad</p>
	<p>Estadio: 5</p> <p>Porción sacra de columna vertebral teñida de azul.</p> <p>Vista dorsal 2X</p>
	<p>Estadio: 6</p> <p>Estructuras craneales teñidas de rojo.</p> <p>Vista dorsal 2X.</p> <p>1-Dentales, 2- Premaxilar, 3-Parietal, 4-Frontal,  Apertura de la fenestra craneal</p>

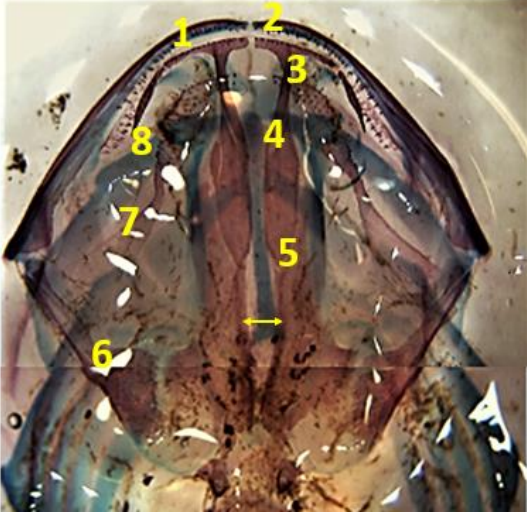

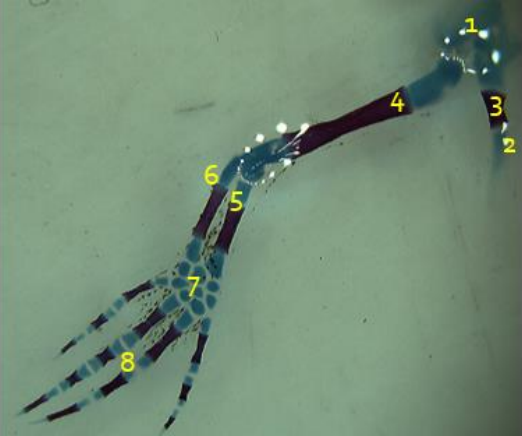

	<p>Estadio: 7</p> <p>Estructuras craneales teñidas de rojo. Vista dorsal 1X.</p> <p>1-Dentales, 2- Premaxilar, 3-Frontal, 4-Parietal, 5-Squamosal, ↔ Apertura de la fenestra craneal</p>
	<p>Estadio: 8</p> <p>Estructuras cartilaginosas teñidas de azul. Pata anterior derecha. Vista ventral. 4x</p> <p>1-Femur, 2-Tibia, 3-Fibula, 4- Tarsos, 5-Carpos</p>
	<p>Estadio: 9</p> <p>Estructuras craneales teñidas de rojo de alizarina. Vista dorsal 1X.</p> <p>1-Dentales, 2- Premaxilar, 3-Frontal 4-Parietal, 5- Squamosal, 6- Basioccipital (Cartilaginoso) 7- Pterigoideo (Formacion)</p>



	<p>Estadio: 10</p> <p>Estructuras cartilagosas teñidas de azul de alcian.</p> <p>Pata anterior derecha. Vista ventral 2X</p> <p>1-Humero, 2-Radio, 3- Ulna, 4-Carpos, 5-Falanges</p>
	<p>Estadio: 11</p> <p>Estructuras cartilagosas teñidas de azul de alcian.</p> <p>Pata posterior derecha. Vista ventral 2X</p> <p>1-Fémur, 2-Tibia, 3-Fibula, 4- Tarsos, 5-Carpos</p>
	<p>Estadio: 12</p> <p>Estructuras óseas teñidas de rojo de alizarina, botones de costillas de tejido cartilaginoso teñidos de azul de alcian.</p> <p>Porción torácica de columna vertebral Vista dorsal. 1X</p>

	<p>Estadio: 13</p> <p>Formación de centro osificación</p> <p>A) pata posterior. B) pata anterior.</p> <p>Vista dorsal. 1X</p> <p>(A) 1-Fémur, 2-Tibia, 3-Fibula, 4- Tarsos, 5-Carpos</p> <p>(B) 1-Humero, 2-Radio, 3- Ulna, 4-Carpos, 5-Falanges</p>
	<p>Estadio: 14</p> <p>Estructuras óseas teñidas de rojo de alizarina, botones de costillas de tejido cartilagenoso teñidos de azul de alcian.</p> <p>Porción torácica de columna vertebral</p> <p>Vista dorsal. 1X</p>
	<p>Estadio: 15</p> <p>Progresión de osificación</p> <p>A) pata posterior. B) pata anterior.</p> <p>Vista dorsal. 1X</p> <p>(C) 1-Fémur, 2-Tibia, 3-Fibula, 4- Tarsos, 5-Carpos</p> <p>(D) 1-Humero, 2-Radio, 3- Ulna, 4-Carpos, 5-Falanges</p>



	<p>Estadio: 16</p> <p>Estructuras craneales teñidas de rojo de alizarina.</p> <p>Vista dorsal 1X.</p> <p>1-Dentales, 2- Premaxilar, 3- Maxilar, 4-Frontal, 5-Parietal, 6-Squamosal, 7-Pterigiodeo, 8- Pre frontal, </p> <p>Apertura de la fenestra craneal</p>
	<p>Estadio: 17</p> <p>Progresión de osificación</p> <p>Pata posterior derecha.Vista ventral 2X</p> <p>1-Cartilago procoracoideo, 2- Suprascapula, 3- Escapula, 4- Humero, 5-Radio, 6- Ulna 7-Carpos. 8-Falanges</p>
	<p>Estadio: 18</p> <p>Progresión de osificación</p> <p>Pata posterior derecha.Vista ventral 2X</p> <p>1-Isquion, 2-Acetaculo, 3-Ilion 4-Femur, 5-Tibia, 6-Fibula, 7- Tarsos 8-Metcarpos</p>

	<p>Estadio: 19</p> <p>Estructuras óseas teñidas de rojo de alizarina, elongamiento de costillas cartilaginosas teñidas de azul de alcian.</p> <p>Porción sacra y caudal de columna vertebral Vista dorsal. 1X</p>
	<p>Estadio: 20</p> <p>Estructuras craneales teñidas de rojo de alizarina.</p> <p>Vista dorsal 1X.</p> <p>1-Dentales, 2- Premaxilar, 3- Maxilar, 4-Frontal, 5-Parietal, 6-Squamosal, 7-Pterigiodeo, 8- Pre frontal, 9- Capsulas óticas, 10- Cuadrado, 11- Exoccipital, \longleftrightarrow Apertura de la fenestra craneal</p>
	<p>Estadio: 21</p> <p>Osificación primaria completa</p> <p>Pata anterior derecha. Vista ventral 2X</p> <p>1-Cartilago procoracoideo, 2- Suprascapula, 3- Escapula, 4- Húmero, 5-Radio, 6- Ulna 7-Carpós. 8-Falanges</p>





Estadio: 23
Osificación primaria completa
Columna vertebral completa. Vista ventral

1- Porción caudal, 2- porción sacra, 3- porción torcida, 4- porción cervical

Tabla 5.- Estadios identificados en la osificación de estructuras esqueléticas en *A. mexicanum* desde su formación cartilaginosa hasta su osificación primaria, siendo los cartílagos de los arcos branquiales las primeras estructuras en aparecer y por ultimo las costillas.

Muestra	Peso promedio por tres repeticiones	Talla promedio por tres repeticiones	Fecha
Eclosión	2.5g	1.7	11/9/2018
Estadio #1	2.7g	2.5cm	20/9/2018
Estadio #2	2.8g	2.5cm	25/9/2018
Estadio #3	4g	3cm	1/10/2018
Estadio #4	7g	3cm	9/10/2018
Estadio #5	11g	3.5cm	17/10/2018
Estadio #6	13g	4cm	26/10/2018
Estadio #7	17g	4.5cm	30/10/2018
Estadio #8	21g	5cm	5/11/2018
Estadio #9	25g	5.5cm	16/11/2018
Estadio #10	27g	6cm	21/11/2018
Estadio #11	30g	6cm	29/11/2018
Estadio #12	33g	7cm	4/12/2018
Estadio #13	36g	8cm	5/1/2019

Estadio #14	40g	9cm	18/1/2019
Estadio #15	44g	11cm	31/1/2019
Estadio #16	49g	11.5cm	4/2/2019
Estadio #17	52g	13cm	21/2/2019
Estadio #18	55g	13cm	1/3/2019
Estadio #19	59g	14 cm	19/3/2019
Estadio #20	62g	14 cm	28/3/2019
Estadio #21	67g	16 cm	2/4/2019
Estadio #22	72g	17 cm	11/4/2019
Estadio #23	75g	19.3cm	24/4/2019

Tabla 6. Peso y talla de los estadios de desarrollo óseo

El sistema esquelético de *A. mexicanum* así como los huesos que lo componen se encuentra completo, en estado de osificación primaria siete meses después de su eclosión.

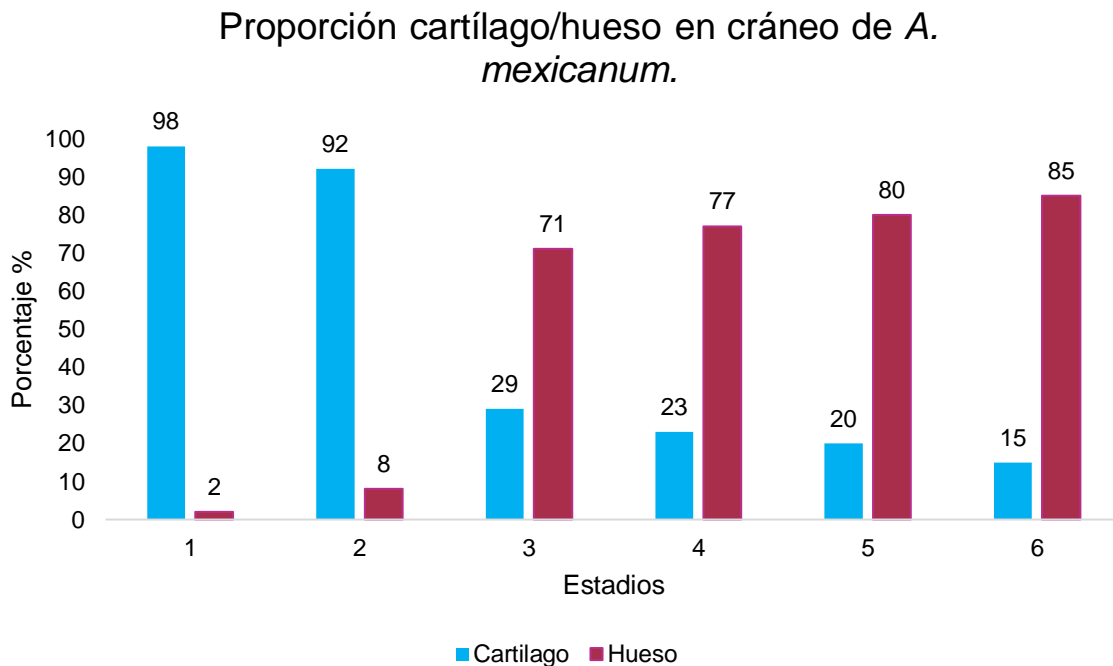
Se mantienen elementos articulados cartilaginosos en estado adulto como escapulas en la cintura escapular, isquion y acetábulo en cintura pélvica además de las propias articulaciones entre fémur/húmero y sus estructuras correspondientes, así como tarsos y metatarsos.



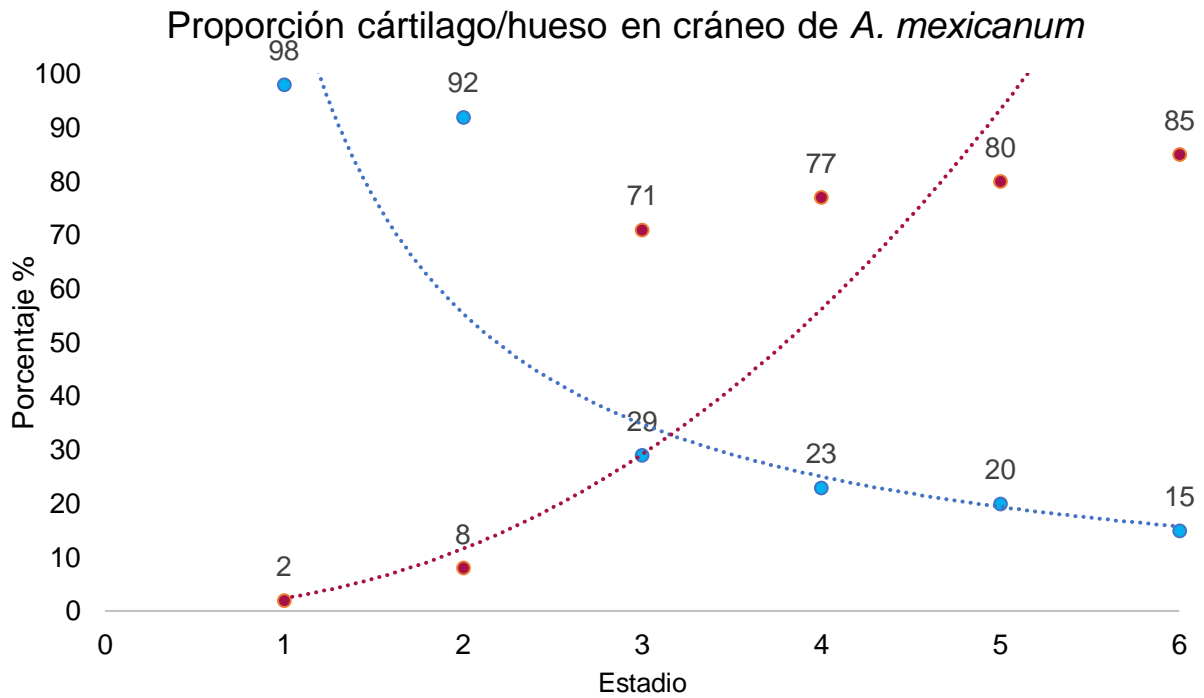
TASA DE CRECIMIENTO

El análisis alométrico se realizó en estructuras de permanencia entre los diferentes estadios de osificación como son: Dentales en el cráneo, húmero/fémur en extremidades a fin de interpretar el crecimiento desde el primer estadio hasta el último. Se realizaron análisis de estadística paramétrica, regresión alométrica y razones entre las estructuras con relación a la longitud total del cuerpo.

El cráneo mantiene dos procesos simultáneos: Formación y crecimiento de cartílago y hueso. La tendencia muestra un decremento del tejido cartilaginoso junto con un aumento del tejido óseo. En su estado adulto después de finalizar el proceso de osificación, se conservan estructuras cartilaginosas correspondientes al aparato hipoidal, representando un 15% del total de mediciones realizadas entre todas las estructuras que conforman el cráneo.



Gráfica 1. Proporción cartílago/hueso en cráneo de *A. mexicanum*. Muestra correlación entre el decrecimiento del cartílago y progresión del desarrollo óseo desde su estadio larval hasta el adulto.



$$y = 2.3814x^{2.2795}$$

$$R^2 = 0.8947$$

Ecuación de regresión y factor de correlación del tejido cartilaginoso

$$y = 122.65x^{-1.146}$$

$$R^2 = 0.8915$$

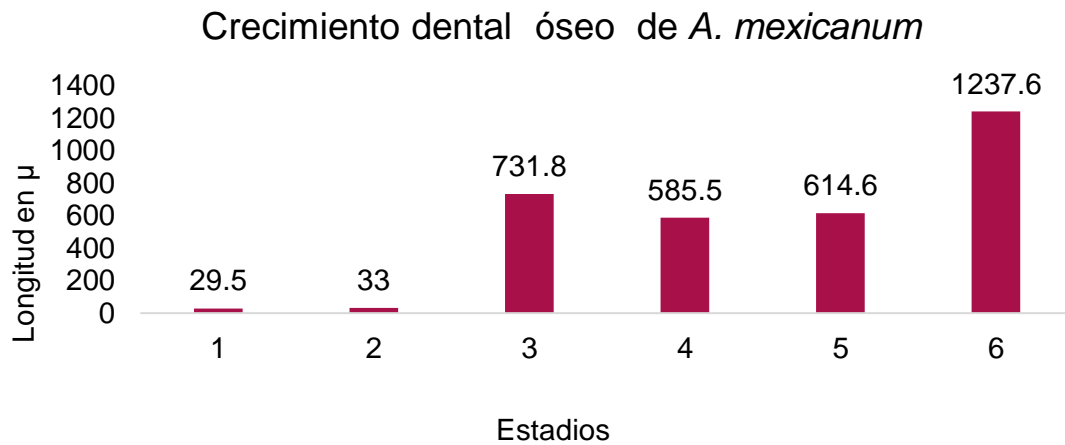
Ecuación de regresión y factor de correlación del tejido óseo

Gráfica 2. Ecuación de regresión alométrica de la proporción cartilago/hueso en cráneo de *A. mexicanum*.

Empleando las ecuaciones se podrán estimar estadios hipotéticos de crecimiento con un 89% de confiabilidad.

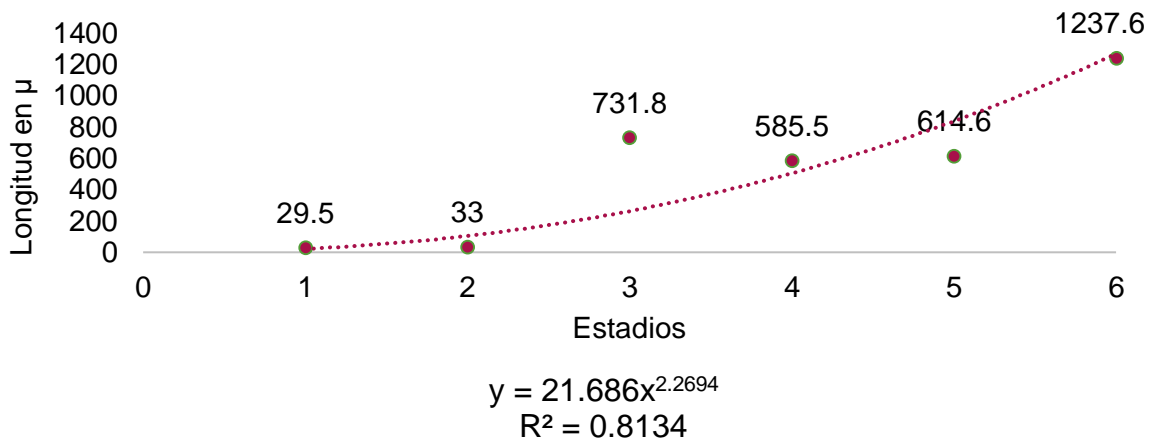


Como estructura presente en todos los estadios de desarrollo del cráneo las dentales muestran un crecimiento lineal, donde el estadio 3 muestra un aumento desproporcionado frente a la tendencia con un incremento de 146.3 μ m en c comparación con el estadio 4 (Gráficas 3 y 4)



Gráfica 3. Crecimiento dental óseo de *A. mexicanum*. Muestra tendencia lineal.

Crecimiento dental óseo de *A.mexicanum*

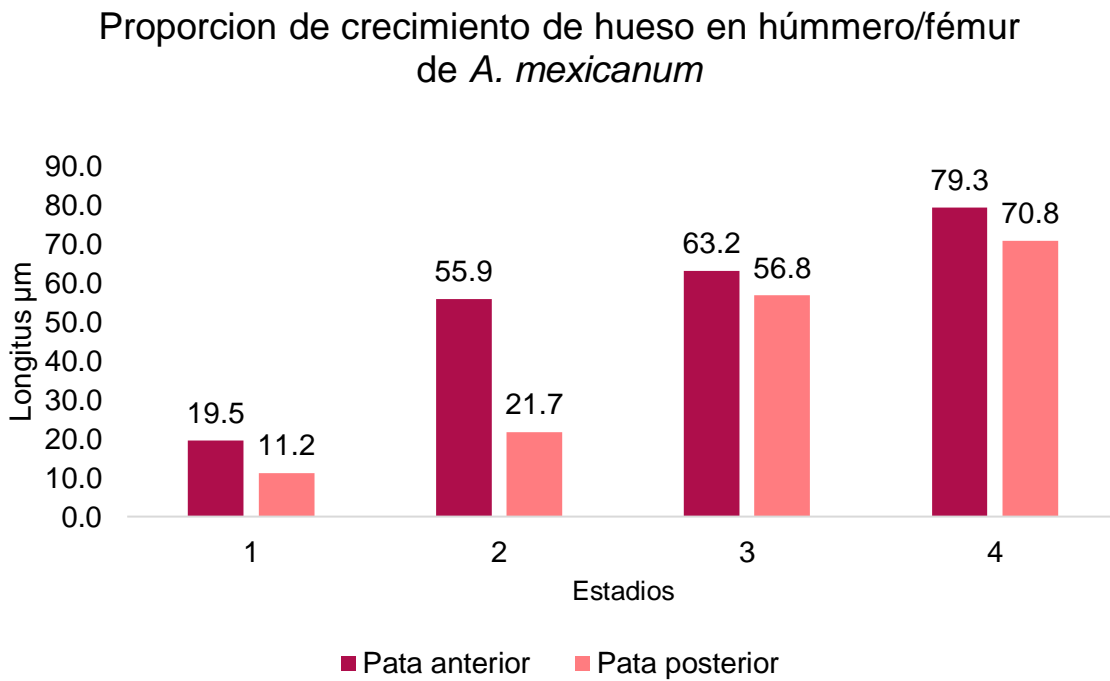
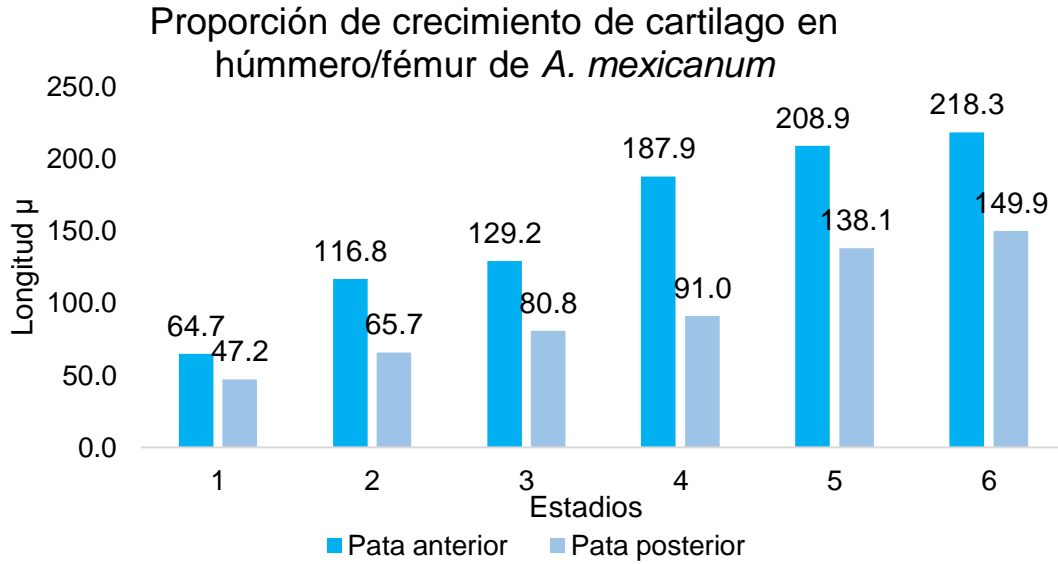


Ecuación de regresión y factor de correlación del tejido óseo

Gráfica 4. Ecuación de regresión alométrica para el crecimiento dental óseo de *A. mexicanum*. Muestra tendencia lineal.

Las extremidades guardan relación entre sí, la primera estructura en evidenciarse es la pata anterior siendo esta la que completa su proceso primero, además de ser más grande que la posterior por 50 μm . Los huesos largos en ambos casos (húmero en pata anterior y fémur en pata posterior) son estructuras que se muestran desde el primer estadio.



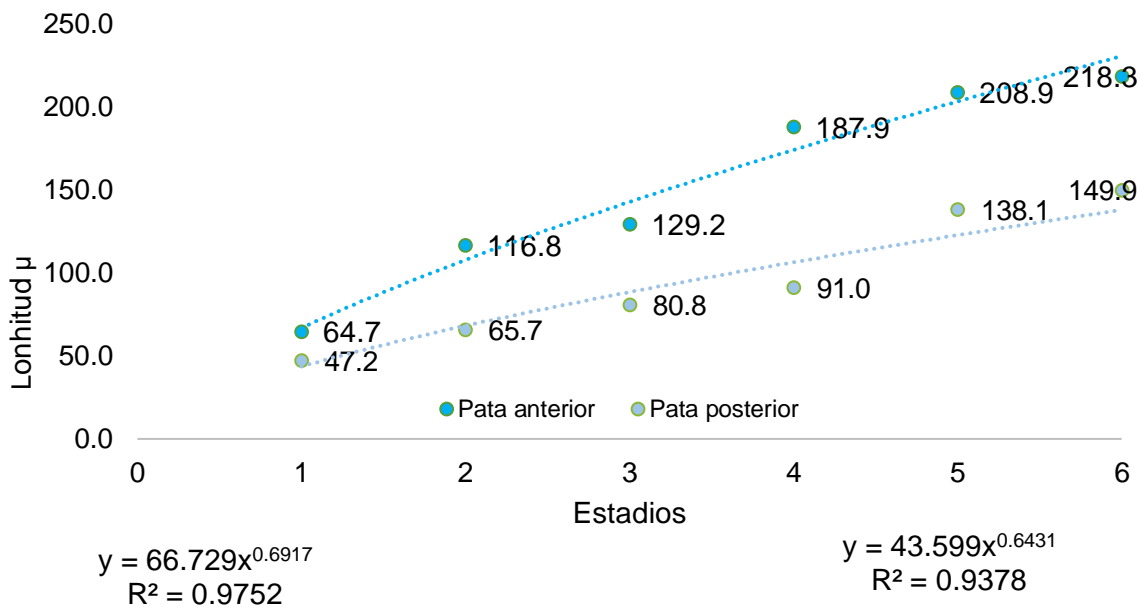


Gráficas 5, 6. Relación entre el crecimiento de cartilago y hueso de huesos largos húmero/fémur en *A. mexicanum*

La proporción entre los estadios de osificación se muestra cercano en el último estadio, con 9 μm de diferencia, mientras en los procesos cartilagosos se observa una disparidad mayor.

Las ecuaciones de regresión alométrica nos permite estimar alguna proporción de las estructuras para inferir el grado de desarrollo en que se podrían encontrar en cualquier estadio hipotético

Proporción de crecimiento de cartilago en pata húmero/fémur de *A. mexicanum*

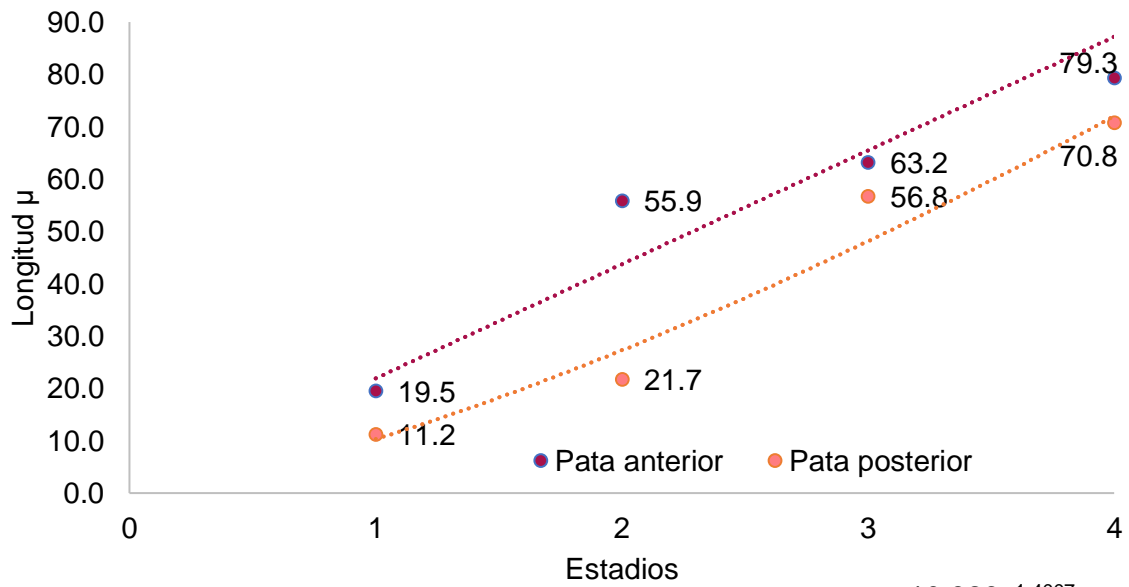


Ecuación de regresión y factor de correlación del tejido cartilaginoso para pata anterior

Ecuación de regresión y factor de correlación del tejido cartilaginoso para pata posterior



Proporcion de crecimiento de hueso en pata
húmmero/fémur de *A. mexicanum*



$y = 21.914x^{0.9961}$
 $R^2 = 0.9614$

Ecuación de regresión y factor de correlacion del tejido óseo para pata anterior

$y = 10.329x^{1.4007}$
 $R^2 = 0.9273$

Ecuación de regresión y factor de correlacion del tejido óseo para pata posterior

Gráficas 6, 7. Ecuación de regresión alométrica para cartílago y hueso en huesos largos de extremidades de *A. Mexicanum*.

Las razones entre las estructuras y la longitud total del cuerpo se hallaron con las fracciones de la longitud total de la extremidad (A) sobre la longitud total del cuerpo (B) en su primer y último estadio de osificación correspondiente

Estructura	Longitud total de la estructura en μm (A)	Longitud total del cuerpo μm (B)	Razón = A/B
Pata anterior (Primer estadio)	327.782429696	50000	1.52015548
Pata anterior (Último estadio)	614.2547836	80000	1.39220859
Pata posterior (Primer estadio)	215.624279023	50000	0.00431249
Pata posterior (Último estadio)	441.208873748	80000	0.00551511
Cráneo (Primer estadio)	3307.48701088	17000	0.194558059
Cráneo (Primer estadio)	14246.28094	140000	0.10175915



Tabla 7. Razones entre las extremidades y cráneo respecto a longitud total del cuerpo.

La estructura corporal guarda relación entre las estructuras o secciones que lo componen, en cuestión longitudinal se mantiene un crecimiento isométrico.



ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE DIAFANIZACIÓN

Todas las muestras fueron tratadas con la misma técnica en sus dos concentraciones correspondientes de acuerdo su talla. Todos los reactivos empleados en las preparaciones de soluciones fueron nuevos, así mismo los utensilios se encontraban estériles. El lugar de trabajo se encontró libre de agentes contaminantes que pudieran causar alteraciones de los resultados.

<p>Muestra transparente sin teñir. Cráneo vista ventral 1x Talla: 3.4cm. Tratamiento: Muestra sumergida en solución azul de alcian al 0.5% en alcohol-ácido acético al 0.3% durante 48h en oscuridad y rojo de alizarina al 0.4% en solución de KOH al 2% durante 48h a temperatura ambiente. Presenta clarificación sin depósito de pigmentos</p>	
<p>Muestra licuada. Vista dorsal 1x Talla 2.7cm. Tratamiento: Muestra sumergida en solución azul de alcian al 0.5% en alcohol-ácido acético al 0.3% durante 48h en oscuridad y rojo de alizarina 0.2% en solución de KOH al 2% durante 24h a temperatura ambiente. Porción cefálica y torácica se encuentran desechas</p>	


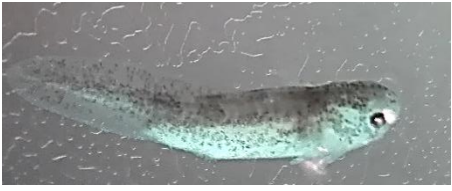
<p>Muestra sobreteñida de rojo de alizarina. Vista ventral 2x. Talla 2.3cm. Tratamiento: Muestra sumergida en solución azul de alcian al 0.5% en alcohol-ácido acético al 0.3% durante 48h en oscuridad y rojo de alizarina 0.2% en solución de KOH al 2% durante 24h a temperatura ambiente. Hiperpigmentación en todo el cuerpo</p>	
<p>Muestra sobreteñida de azul de alcian. Vista dorsal. 2x. Talla 1.4cm. Tratamiento: Solución azul de alcian al 0.5% en alcohol-ácido acético al 0.3% durante 24h en oscuridad a temperatura ambiente. Hiperpigmentación de azul de alcian</p>	

Tabla 8. Muestras que no respondieron a la técnica de diafanización. Las incidencias se presentaron únicamente en larvas menores a 5cm de talla en la sección de clarificación y tinción con alizarina mayoritariamente.

Las tinciones de cartílago tuvieron iguales condiciones de aplicación y tiempo de reposo para todas las muestras, los grupos tetrametil-isouronio con carga positiva presentes en el colorante se enlazan con los glucosaminoglicanos sulfatados de naturaleza polianionica presentes en la matriz extracelular del cartílago. La intensidad de coloración fue variable pues es dependiente al ph y grado de desarrollo del tejido, siendo el cartílago maduro el más permeable y por tanto el



más coloreado por lo que es importante no confundir los resultados con la intensidad de tinción o efectividad de la solución empleada (Figuras 9 y 10)

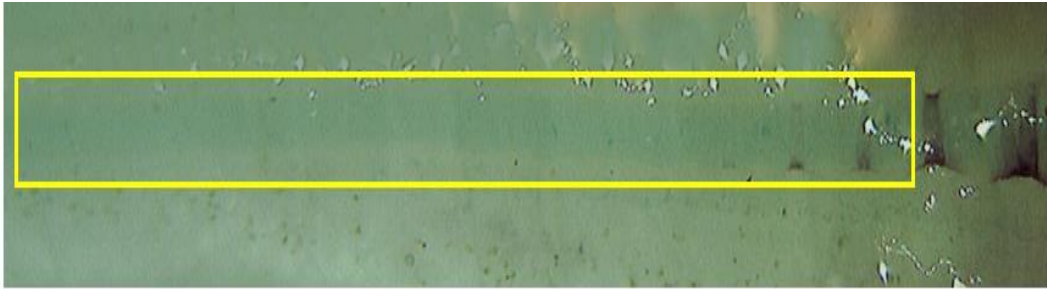


Figura. 9. Cartílago en formación teñido con azul de alcian. Columna vertebral: porción sacra y lumbar. Vista dorsal. 4X. Tejido cartilaginoso (amarillo) en formación presenta una leve tinción apenas visible concordante con su grado de desarrollo

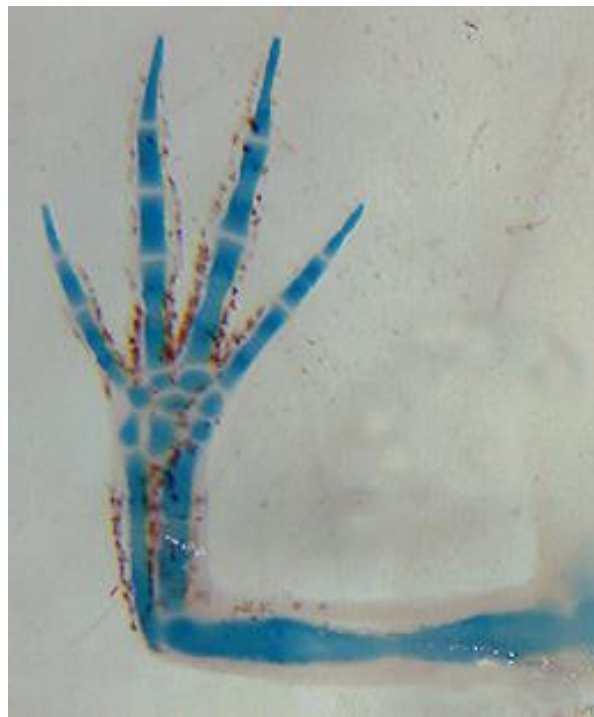


Figura. 10. Cartílago maduro teñido con azul de alcian. Pata anterior derecha. Vista dorsal. 1X. El tejido maduro al tener mayores concentraciones de glucosaminoglicanos contenidos en la matriz extracelular presenta mayor captación de colorante

De igual forma las condiciones de aplicación de la solución de KOH y rojo de alizarina fueron las mismas para todas las muestras; Siendo los tiempos de reposo variables entre las tallas empleadas. Las tallas menores a 5 cm tuvieron un tiempo de reposo promedio de 3 días para complementar la digestión de tejidos blandos y pigmentación, a comparación de las tallas mayores a 5m cuyo tiempo de reposo llego a 7 días. De igual forma la intensidad de coloración es dependiente del grado de desarrollo del tejido (Figuras 11 y 12) ya que el proceso de tinción ocurre tras la quelación de una molécula de calcio por dos moléculas de alizarina, los átomos de oxígeno, así como los de los grupos quinona y fenol de la alizarina ceden sus electrones formando enlaces el calcio. Es oportuno especificar que la preparación en la solución de rojo alizarina a un pH alcalino, a fin de evitar la descalcificación en el hueso



Figura. 11. Tejido óseo en formación coloreado con rojo de alizarina. Cráneo vista dorsal. 1x. Leve tinción de prefrontales concordante con su grado de desarrollo



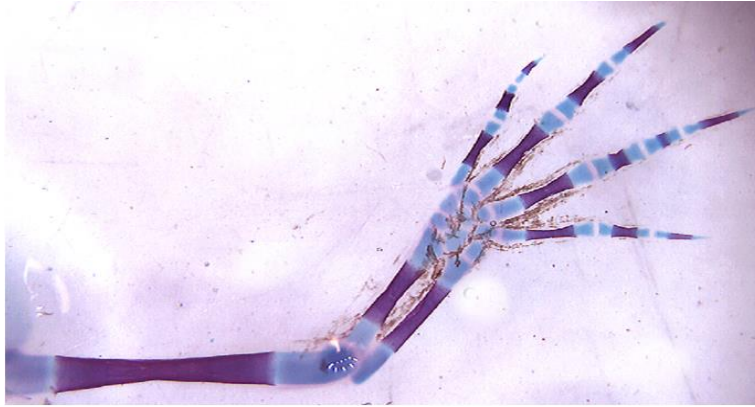


Figura. 11. Tejido óseo en maduro coloreado con rojo de alizarina. Pata anterior derecha. 1x. Grado de pigmentación intenso concordante con grado de desarrollo, las moléculas de alizarina se fijan a los fosfatos de calcio que se encuentran en el hueso

La digestión de tejidos blandos se lleva a cabo con la solución de KOH de naturaleza alcalina. La clarificación se produce por el uso de la glicerina obteniendo resultados deseados.



Figura. 12. Muestra clarificada y teñida con azul de alcian y rojo de alizarina. Vista ventral. 1x. Presenta clarificación total

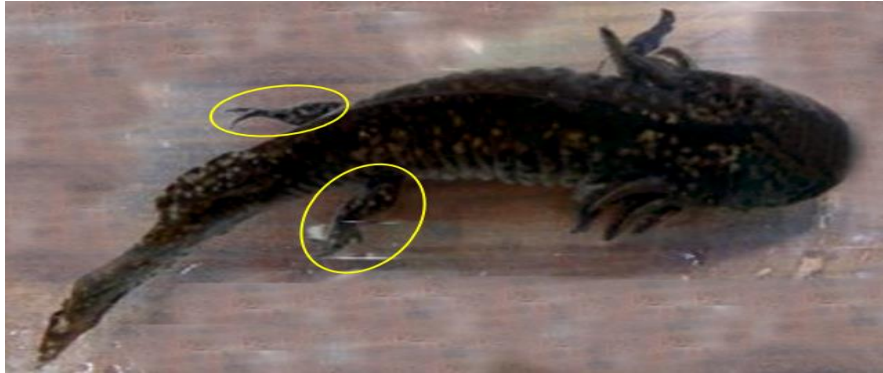
De los 70 organismos usados solo 4 no respondió a la técnica mostrando que la aplicación propuesta con sus concentraciones y tiempos de reposo es propicia en *A. mexicanum* en sus estadios larvales y juveniles

IDENTIFICACIÓN DE MALFORMACIONES DENTRO DE LA POBLACIÓN



Organismo presenta escoliosis, se define como la desviación lateral de la columna vertebral. Al rededor del 85% de los casos su causa es desconocida, se considera como patología mecánica del raquis. (A) organismo sano. (B) organismo con escoliosis.





Organismo presenta raquitismo en las extremidades anteriores y posteriores observándose disminución entre el límite entre la epifisis y la metafisis que se hace irregular. Con el déficit de vitamina D, se absorbe menor cantidad de calcio tratando de evitar la hipocalcemia se contrarresta produciendo mayor cantidad de hormona paratiroidea. La fosfatasa alcalina se sobre produce como respuesta a la incrementada proliferación osteoide compensadora de la deficiente osificación



Organismo presenta anoftalmía congénita del ojo derecho; Caracterizada por la ausencia total de tejido ocular dentro de la órbita.

Asociada a la expresión de los genes OTX2, PAX2, PAX6, CHD7 y preponderantemente del SOX2 localizado en el cromosoma 3q26



Organismo muestra rotación con torsión interna de la pata posterior derecha. Ocasionalmente problemas en el desplazamiento, resultan de un crecimiento desproporcionado del hueso. La predisposición genética y el trauma son fuertemente asociados

Tabla 8. Malformaciones dentro de la población: Los casos presentes tuvieron orígenes de naturaleza genética asociada a genes autosómicos

DISCUSIÓN

DESARROLLO EMBRIONARIO

Ambystoma mexicanum muestra un desarrollo típico a nivel morfogénico, aunque lento comparado con *X. leavis*, *Ceratophrys stolzmanni*, *Engystomops randi* que en 10, 14 y 24 horas respectivamente finalizan la gastrulación. La embriogénesis involucra procesos de segmentación, proliferación, gastrulación, neurulación y organogénesis identificados en 31 estadios hasta la eclosión de las larvas motiles con un periodo de duración de 15 a 17 días, que comprado *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus* resulta una media pues estos organismos completan su desarrollo en 21 días (Francisca Hervas., et al. 2015); La duración de la gestación parece estar relacionada con el tamaño de los huevos en cuestión así como el medio en el cual se desarrollen; Siendo los huevos más grandes los más tardíos así como los que han sido depositados en sustratos no sumergidos en agua, por su parte los huevos de *A. mexicanum* tienen un tamaño promedio de 2mm y se desarrollan únicamente bajo el agua lo cual podría estar relacionado con su periodo de formación.

Los patrones de clivaje de *A. mexicanum* son concordantes con los demás anfibios, la formación del blastoporo inicia desde el polo animal completamente distinguible de su contraparte el polo vegetativo, a diferencia de la rana con desarrollo directo *Eleutherodactylus coqui* donde la colocación del labio dorsal del blastoporo se realiza ecuatorialmente (Schlosser G. 2003). En *A. mexicanum* la gastrulación es un evento independiente de la neurogénesis contrario a *X. leavis*; Principia sobre el eje dorsal del blastoporo y se finaliza en un periodo promedio de 50 hr con el cierre del blastoporo. En algunos casos las características conservadas de la gastrulación se ven alteradas: La salamandra gigante *Megalobatrachus maximus* y la rana *Rhacophorus* cuya formación del labio dorsal del blastoporo no llega a concretarse (Keller R., et 2004). *X. leavis* inmediatamente comienza la neurulación sin ser necesario el cierre del blastoporo superponiendo la formación del arquenteron, significando una rápida formación de la cresta neural en comparación con la somitogenesis lo cual puede estar

asociado a la activación de la ruta Wnt durante la gástrula media (del Pino E. M., *et al.* 2007).

Una vez establecidas las capas germinales se da paso a la neurulación, proceso bien establecido donde sus etapas primaria y secundaria no son superpuestas, aunque si consecutivas, las crestas neurales se fusionan en aproximadamente 13 hr para establecer la somitogenesis cuando se haya cerrado el tubo neural. La somitogenesis es apreciable desde el estadio 20 (Tabla 3).

Consecutivamente, se desarrolla el surco hiomandibular y posteriormente el sistema pronéfrico junto con las protuberancias correspondientes a la zona branquial. Los ambystomatidos como organismos no metamórficos mantiene la estructura larval durante toda su vida es así como los últimos estadios están destinados únicamente al crecimiento en talla y peso, la aleta dorsal se establece y emergen los filamentos branquiales. Las larvas rompen las ya adelgazadas capas vitelinas y emergen como larvas motiles.

OSTEOGÉNESIS

La formación de tejido cartilaginoso y óseo se conserva en todos los filos; Los huesos son el resultado de diversos procesos coordinados guiados por señalización bioquímica, entre los que se destacan la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y producción de tejido. El sistema esquelético brinda forma y soporte mecánico, mantiene la postura del cuerpo, funciona como anclaje de músculos, protege las vísceras contra daños mecánicos y es la principal fuente de locomoción; Es así como las estructuras y los tejidos que lo componen tienen funciones que responden a las necesidades del organismo.

En *Ambystoma mexicanum* las primeras estructuras en evidenciarse por medio de la técnica de diafanización fueron los arcos branquiales, y el aparato hipoidal que se encuentran compuestos de cartílago. Las funciones respiratorias que cumplen los arcos branquiales internos y branquias externas son vitales para el organismo (Tabla 4, estadios1-2) mientras el aparato hipoidal cumple obras relacionadas



con la sujeción de lengua y músculos mandibulares, el cartílago hialino del que se constituye brinda soporte elástico a las piezas que lo forman siendo estas el primer apoyo para mantener la forma del cráneo.

Después de la eclosión los alevines comienzan a alimentarse de pulga de agua cuyas dimensiones no exceden los 2 mm de longitud siendo fáciles de tragar sin representar mayor requerimiento físico como la dentadura. Al llegar a la talla de 2 cm las larvas se alimentan de tubifex el cual por su estructura tienen que desgarrar y masticar para tragar; En sincronía con esto se identificó la mineralización primaria de las estructuras dentales comenzando por la sección vomero-palatinos y maxilares frontales (Tabla 4, estadio 2) presuntamente adecuándose a los nuevos requerimientos, el desgarrar requiere de estructuras resistentes como los dientes; Mientras, aún los elementos craneales se encuentran en estado cartilaginoso.

Las tres regiones que componen el cráneo son: Condrocráneo, dermocráneo y esplacnocráneo. El condrocráneo es la primera porción en hacerse presente mediante la osificación de los parietales (Tabla 4, cuadro 3) la porción más anterior de la región cefálica en la que se encuentra, le permite brindar protección al cerebro, ojos, órganos olfatorios y el oído medio.

Después de la eclosión y estadios larvales inmediatos los anfibios de desarrollo directo y metamórfico desarrollan las extremidades después de que inician alimentarse por depredación, un mes después de la eclosión inicia la emergencia de las extremidades anteriores desde el primordio (Tabla 4, estadio 4); Las funciones de locomoción en su estado larval inicial se realizan mediante la natación, a través del bateo de la aleta dorsal de esta manera en su primer estadio de desarrollo la columna vertebral se mantiene cartilaginosa (Tabla 4, estadio 5) para ser flexible y ligera en función de las cualidades que requiere el bateo sumado a esto el cartílago ha demostrado tener mayor capacidad regenerativa haciendo al organismo más resiliente a los ataques por depredación a los cuales se encuentra más susceptibles en su estado larval.

Conforme las larvas aumentan de talla mejoran sus habilidades depredativas, y comienzan a alimentarse de peces pequeños como charales a lo cual el sistema mandibular y el aparato dental responden osificando los premaxilares y maxilares laterales mientras la mandíbula prepara al squamosal como el principal suspensorio del aparato dentario.

Si bien los anfibios anuros guardan semejanzas anatómicas entre ellos, igualmente presentan divergencias entre algunas estructuras; En su estructura mandibular los renacuajos presentan el palatoc cuadrado alargado y en contraparte una reducción en el cartílago de Meckel. Como estructuras anexas cuentan con cartílagos infrarostral y suprarrostral para la sujeción de la boca, al completar la metamorfosis se pierden los cartílagos suprarostrales e infrarostrales, el cartílago de Meckel se alarga reorganizando así al palatoc cuadrado que se desplaza anteriormente (Wassersug RJ & Hoff K. 1982). Mientras tanto en *Ambystoma mexicanum* al no tener procesos metamórficos, las estructuras craneales que se evidencian conforme al proceso de osificación se conservan durante toda su vida.

El desarrollo de las extremidades después de la evaginación del primordio se observa con la elongación en dirección proximodistal del estilopodo (húmero/fémur). En las salamandras se encuentra conservado el patrón de desarrollo de las extremidades, siendo las anteriores las primeras. De igual forma en *A. mexicanum* las patas delanteras fueron las primeras en aparecer. La formación de los dígitos sigue el mismo patrón de las salamandras en el siguiente orden de los dígitos II - I - III - IV y V en la extremidad posterior (Fröbisch N. B & Shubin N. H. 2011). Contrariamente a las ranas que se desplazan en el agua por bateo de las membranas interdigitales, *A. mexicanum* nada además por la propulsión de la aleta, sacudiendo sus dedos uno a uno.

A partir del estadio 12, tres meses después inicia la osificación de los miembros y columna vertebral. En ambos casos las extremidades principian su proceso desde la diáfisis de la estructura, comenzando por el estilopodo húmero/fémur, seguido por el seugopodo y finalmente el autopodo.



Tras siete meses después de su eclosión el cráneo en sus estadios finales muestra la aparición de las cápsulas óticas, cuadrado y el exoccipital. Las capsulas óticas en su región más anterior funcionan como un sistema sensorial, pues *A. mexicanum* carece de oído medio. El cuadrado se relaciona con el sistema mandibular y los exoccipitales con funciones cerebrales. Las aperturas fenestrales se van cerrando conforme al proceso de crecimiento.

Respecto al número de vertebras *A. mexicanum* mantiene un promedio de 50 vertebras totales, existe un vínculo entre la respuesta de escape y el número de vertebras caudales y sacras siendo los organismos con un mayor número de vertebras los que presentar un mejor rendimiento mecánico frente a la respuesta de escape, a su vez la formación de las vértebras está relacionada con la temperatura a la cual se incuban los huevos donde las temperaturas entre 12C° y 16C° propician un mayor número de vertebras (Ackerly K. L. & Ward A. B. 2015). Esto concuerda con las temperaturas a las cuales se mantienen los huevos en embriogénesis para este estudio. Las últimas piezas en aparecer son las costillas verdaderas y las costillas flotantes. Ocho meses después todas las estructuras se encuentran completamente desarrolladas.

SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO

El crecimiento esta guiado por el código genético, expresado en sus procesos bioquímicos y morfológicos que se aprecian en los distintos procesos señalados, sumado a esto las presiones ambientales a las cuales están expuestos los organismos juegan un papel fundamental: El medio en el cual se desenvuelvan los organismos dictará las características que estos tendrán es así como *A. mexicanum* al ser un organismo acuático aunque, con la capacidad de reptar requiere de estructuras rígidas para mantener la forma del cuerpo y sostener su peso; Los estadios correspondientes a la etapa larval inicial muestran el desarrollo del tejido cartilaginoso, mostrando relación entre las extremidades, siendo la pata anterior la primera en completar su proceso. Las larvas tempranas están propensas a los ataques por depredación, es a si como los tejidos

cartilagosos preponderantes en estos estadios obtienen ventaja para el organismo. Junto con el cambio de alimentación las estructuras óseas del cráneo pertenecientes a las dentales se muestran, el ritmo de osificación se encuentra desfasado en su estadio 3 indicando un crecimiento mayor del esperado presuntamente se encuentra relacionado con el cambio de dieta dentro de la población al recibir porciones de filete por alimentación asistida, que por su naturaleza mantiene rigidez, reclamando estructuras fuertes y amplias para el desgarrar; Es posible que en su estado silvestre las habilidades depredativas se perfeccionen dentro de este periodo. *A. mexicanum* caza a sus presas en movimiento, simultaneo en la natación abre el hocico y se aproxima a la presa, si le es posible sostiene débilmente a la presa con las patas anteriores, al tiempo que muerde y desgarrar el tejido cuando su presa es grande y no puede engullirlo entero. La tendencia de crecimiento se estabiliza nuevamente en los estadios siguientes. Los ritmos referentes a la osificación para las extremidades muestran valores similares en los últimos estadios, relacionado a los requerimientos que experimentan los organismos tales como, la respuesta de escape y requerimiento mecánico para salir de la vegetación en ambientes silvestres.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Cada paso de la técnica modifica la muestra en relación a los reactivos usados: Primeramente el formol inactiva las de enzimas autolíticas impidiendo la degradación de los tejidos, las células componentes del cartílago reaccionan con el azul alcian que cuenta con una gran afinidad por los glucosaminoglicanos (en un pH ácido) que abundan en la matriz extracelular cartilaginosa (Simons EV., *et al.* 1971). La solución de KOH y alizarina actúan por su naturaleza corrosiva limpiando los tejidos y coloreando la matriz mineralizada de los huesos. La digestión y tinción de tejido se realiza dependiente de la cantidad de grasa del organismo (Tamayo LJ., *et al.* 2012).



Las técnicas de diafanización son variadas debido a las diferencias en densidad de tejidos y complejidad de los organismos (Darias., *et al.* 2010). Bajo el mismo fundamento se encuentran diversas modificaciones que involucran distintos tiempos de reposo y orden de los pasos que la integran.

Los contrastes entre los resultados del uso de KOH, NH₄OH, y NaOH como agente corrosivo para la digestión de tejidos en pez cola de espada (*Xiphophorus shelleri*) mostraron que NH₄OH malforma las muestras e hiperpigmenta en tonos morados, NaOH hizo perder tonicidad a las muestras (Gómez M., *et al.* 2017). Finalmente el tratamiento KOH limpia los tejidos blandos manteniendo la firmeza y forma natural del cuerpo mismo empleado en este estudio donde se obtuvieron resultados afines.

En comparación la técnica original de Dawson, Técnica original doble-tinción (Tripsina) y Técnica modificada de doble-tinción (Tripsina modificado a Papaína) reportan distintos grados de clarificación y pigmentación en tortuga golfina (*Lepidochelys olivácea*) siendo la tripsina como corrosivo insuficiente en la limpieza de los tejidos, además de licuar algunas muestras parcial y totalmente en comparación a los hallazgos encontrados de únicamente una muestra parcialmente macerada al emplear KOH como corrosivo. (Hernández-Gil. 2015). Sumado a esto se reportan sesenta y nueve muestras con resultados favorables de las noventa y nueve muestras usadas en la implementación de las técnicas mencionadas, representando solo el 60% de efectividad contrario al 94.29% de rendimiento pues de las 70 muestras empleadas en este estudio 4 muestras no respondieron. Los bajos porcentajes de productividad implican pérdidas de recursos económicos y organismos.

Los usos de la técnica son dirigidos en su mayoría a organismos adultos, cuya composición ósea se encuentra madura; En otros casos la aplicación en estadios embrionarios o larvales ha sido implementada prioritariamente en mamíferos y aves mas no en anfibios. Sandoval D., *et al.* 2016) formularon una modificación a la técnica original de Dawson para doble tinción en embriones de ratones donde la deshidratación se realiza con acetona en lugar de tren de alcoholes,

se pigmenta de alcian seguido de alizarina, posteriormente se clarifica y limpian tejidos en solución combinada de glicerina y KOH; De acuerdo a los tiempos de reposo para cada paso una muestra final estaría completa alrededor de 10 días. Dividir el proceso de pigmentación y corrosión alarga innecesariamente el tiempo de tratamiento. Las muestras empleadas en este estudio fueron teñidas y maceradas en conjunto en un tiempo máximo de 8 días, facilitando el avance de la investigación.

Las concentraciones empleadas, así como los tiempos de reposo fueron los correctos para resultados óptimos

MALFORMACIONES DENTRO DE LA POBLACIÓN

Se estima que el 65% de las causas de malformaciones es atribuido a factores desconocidos, mientras que 25% se asocia a factores genéticos y finalmente 10% a factores ambientales como agentes teratogénicos.

Distintos estudios reportan los efectos de agentes teratogénicos químicos y biológicos que tienen sobre los organismos; La influencia de teratogénicos responde al genotipo del organismo, cada especie reacciona distintamente a un mismo teratogéno, la etapa en la cual se haya expuesto al organismo resulta determinante, se considera la organogénesis como el estadio más susceptible (Morínigo Egusquiza G. M. 2016).

Sin embargo, los organismos criados en cautiverio usados para este estudio gozan de un ambiente controlado, aminorando así la ocurrencia de estos eventos. Dentro de las causas genéticas los genes implicados actúan en los procesos del desarrollo como la proliferación, diferenciación, migración celular, apoptosis, inducción, transformaciones epitelio-mesenquimáticas e interacciones tisulares relacionados con la correcta formación del organismo (Lascano C. I., *et al.* 2009).

Otros más como los factores ambientales y asociados a la alimentación también participan: Las deficiencias nutricionales se correlacionan con eventos de



raquitismo (Halty., *et al.* 2006) por su parte la hipertermia se ha reportado como factor en la presencia de anoftalmia (Carezcan F. J., *et al.* 2016).

De los 526 organismos que conforman la población la cual se empleó en la investigación, 4 de ellos resultaron afectados con alguna malformación de origen únicamente genético indicando el buen estado de conservación que tienen dentro de las instalaciones del ajolotario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Los organismos que presenten alguna malformación precisan de un mayor control en su manejo y condiciones ambientales.

CONCLUSIONES

La muestra empleada en este estudio atravesó por 31 estadios embrionarios entre los cuales se distingue:

- Segmentación
- Gastrulación
- Neurulación: Primaria, secundaria
- Organogénesis
- Crecimiento

La modificación a la técnica de Dawson implementada tiene un 94.29% de rendimiento

Se identificó un 0.76% de malformaciones dentro de la población



LITERATURA CITADA

- ✿ Afful, GE, Luchko, EN, Dyomina, YV y Filiptsova, OV (2018). Biodiversidad y biología de los axolotls.
- ✿ Aguilar, M. X., Casas-Andreu, G. y Pineda, A. E. 2002. *Ambystoma lermaense* (Lake Lerma Salamander). Reproduction and Development. *Herp. Rev.* 33 (3):197.
- ✿ Anderson, J. D. & R. D. Worthington. 1971. The life history of the Mexican salamander *Ambystoma ordinarium* Taylor. *Herpetologica* 27:165–176.
- ✿ Armstrong, J. B., Duhon, S. T., & Malacinski, G. M. (1989). Raising the axolotl in captivity. *Developmental biology of the axolotl*, 220-227.
- ✿ Bartra, R., & Viñas, G. V. (Eds.). (2011). *Axolotiada: vida y mito de un anfibio mexicano*. Fondo De Cultura Economica USA.
- ✿ Bordzilovskaya, N. P., Dettlaff, T. A., Duhon, S. T., & Malacinski, G. M. (1989). Developmental-stage series of axolotl embryos. *Developmental biology of the axolotl*, 201, 219.
- ✿ Browne, RK, Silla, AJ, Upton, R., Della-Togna, G., Marcec-Greaves, R., Shishova, NV, Kaurova, SA (2019). Recolección y almacenamiento de esperma para la gestión sostenible de la biodiversidad de anfibios. *Theriogenology* , 133 , 187-200.
- ✿ Carezzano, F. J., Bardone, S. P. U., & Dorflinger, K. (2016). Anoftalmia en *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815)(Anura: Leptodactylidae) de un agroecosistema de Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 3(1), 101-104.

- ✿ Carrizo, SF, Jähnig, SC, Bremerich, V., Freyhof, J., Harrison, I., He, F., ... y Darwall, W. (2017). Megafauna de agua dulce: buques insignia para la biodiversidad de agua dulce bajo amenaza. *Bioscience*, 67 (10), 919-927.
- ✿ Casas, G., R. Cruz, y X. Aguilar. 2004. Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl (*Ambystoma*: caudata: anphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia Ergo Sum*. 3(10) 304-308.
- ✿ Ceballos, G., Cruzado, J., & Colón, C. (2005). Conservación de fauna en peligro de extinción en el bosque de Chapultepec. *BioDiversitas*, 61, 12-15.
- ✿ Clarke, Samuel F. *Development of Amblystoma punctatum*. Harvard University, Museum of Comparative Zoology, Ernst Mayr Library. 1879.
- ✿ Del Pino, E. M., Venegas-Ferrín, M., Romero-Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Sáenz-Ponce, N., Moya, I. M., ... & Taira, M. (2007). A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the national academy of sciences*, 104(29), 11882-11888.
- ✿ Díaz-Pérez Angel Daniel. Descripción anatómica del sistema óseo de *Ambystoma mexicanum* a través de la técnica de transparentación. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes Iztacala, Tlanepantla Estado de Mexico .Mayo 2015.
- ✿ Echtermeyer, F., Bertrand, J., Dreier, R., Meinecke, I., Neugebauer, K., Fuerst, M., & Pap, T. (2009). Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nature medicine*, 15(9), 1072.
- ✿ Elinson, R. P., & del Pino, E. M. (2012). Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(3), 345-369.
- ✿ Frías-Alvarez, P., Zúniga-Vega, J. J., & Flores-Villela, O. (2010). A general assessment of the conservation status and decline trends of Mexican amphibians. *Biodiversity and Conservation*, 19(13), 3699-3742.
- ✿ Fröbisch, N. B., & Shubin, N. H. (2011). Salamander limb development: integrating genes, morphology, and fossils. *Developmental Dynamics*, 240(5), 1087-1099.



- ✿ Gilbert, S. F. (2005). *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana.
- ✿ Gómez, M. D. C. R., Colín, R. M., Fabila, G. S., Araiza, M. F., León, M. C., & Cortes, H. D. J. C. (2017). Evaluación del efecto de tres hidróxidos en la calidad de diafanización de peces de cola de espada (*Xiphophorus helleri*). *Revista AquaTIC*, (46), 1-9.
- ✿ Halty, M., & Caggiani, M. (2006). Raquitismo vitamina D dependiente tipo I. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 77(2), 160-167.
- ✿ Hernandez, A. (2019). First observations on cave breeding in *Salamandra algira splendens* from north-eastern Morocco. *Herpetological Bulletin*, 149, 34-37.
- ✿ Hernández-Gil, Y., Lara-Uc, M. M., & Reséndiz, J. E. (2015). Comparación de técnicas de diafanización para la observación de estructuras óseas de crías de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1824)(Reptilia, Cheloniidae). *Ciencia y Mar*, 24(56), 19-27.
- ✿ Hervas, F., Torres, K. P., Montenegro-Larrea, P., & del Pino, E. M. (2015). Development and gastrulation in *Hyloxalus vertebralis* and *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae). *Amphibian & Reptile Conservation*, 8(1), 121-135.
- ✿ Iwata, R., Makanae, A., & Satoh, A. (2019). Stability and plasticity of positional memory during limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Dynamics*.
- ✿ Keller, R., Shook, D., & Stern, C. D. (2004). In *Gastrulation: From Cell to Embryo*.
- ✿ Lascano, C. I., Sotomayor, V., Ferrari, A., & Venturino, A. (2009). Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta toxicológica argentina*, 17(1), 8-19.
- ✿ Lourenço, A., Gonçalves, J., Carvalho, F., Wang, I. J., & Velo-Antón, G. (2019). Comparative landscape genetics reveals the evolution of viviparity reduces genetic connectivity in fire salamanders. *Molecular ecology*, 28(20), 4573-4591.

- ✿ Majchrzak, A. 2004. *Ambystoma mexicanum* axolotl. Animal Diversity Web: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ambystoma_mexicanum.html. Consultado el 25 de septiembre del 2019.
- ✿ Morínigo Egusquiza, G. M. (2016). Ecotoxicología en anfibios: un análisis cuantitativo (Bachelor's thesis).
- ✿ Olvera-Ramos, José Ariel. Contribución al estudio del cráneo de *Ambystoma mexicanum*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Los Reyes Iztacala, Tlaxcala Estado de México. Julio 2003.
- ✿ Sáenz-Ponce, N., Santillana-Ortiz, J. D., & del Pino, E. M. (2012). The gastrocoel roof plate in embryos of different frogs. *Differentiation*, 83(2), S62-S66.
- ✿ Sandoval, D., Téllez, J., García, A., Rivera, G., Moreno, S., & Moreno, F. (2016). Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo. Revisión de la literatura. *Universitas Médica*, 57(4), 488-501.
- ✿ Sefton EM, Piekarski N & Hanken J. (2015). Dual embryonic origin and patterning of the
- ✿ Shapiro, F., & Forriol, F. (2005). El cartílago de crecimiento: biología y biomecánica del desarrollo. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 49(1), 55-67.
- ✿ Sibai, M., Parlayan, C., Tuğlu, P., Öztürk, G., & Demircan, T. (2019). Integrative Analysis of Axolotl Gene Expression Data From Regenerative and Wound Healing Limb Tissues. *Scientific Reports*, 9(1), 1-15.
- ✿ Simons, E. V. (1971). A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. *Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavica*, 8(4), 281-292.
- ✿ Tamayo Arango, L. J., Suárez Avendaño, P. A., Cano Valderrama, A. I., Cuartas Martínez, B. A., Ciro, Y., Sergio, A., & Lenis Sanin, Y. Y. (2012). Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(4), 620-624.



- ✿ Thygesen, M. M., Lauridsen, H., Pedersen, M., Orlowski, D., Mikkelsen, T. W., & Rasmussen, M. M. (2019). A clinically relevant blunt spinal cord injury model in the regeneration competent axolotl (*Ambystoma mexicanum*) tail. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(3), 2322-2328.
- ✿ Van der Kraan, P. M., Davidson, E. B., Blom, A., & Van den Berg, W. B. (2009). TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and cartilage*, 17(12), 1539-1545.
- ✿ Voss, S. R., Ponomareva, L. V., Dwaraka, V. B., Pardue, K. E., Baddar, N. W. A. H., Rodgers, A. K., ... & Khatri, S. (2019). HDAC Regulates transcription at the outset of Axolotl tail Regeneration. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- ✿ Wang, M., Shen, J., Jin, H., Im, H. J., Sandy, J., & Chen, D. (2011). Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1240, 61.
- ✿ Whiteley, M., & Armstrong, J. B. (1990). Isolation and characterization of a developmentally regulated homeobox sequence in the Mexican axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(3), 622-629.
- ✿ Zambrano, L., Reynoso, V. H., & Herrera, G. (2004). Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Informe final del proyecto AS004, México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), IBUNAM.