



CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS - UNIPAC

Matheus Kasmiroski Nunes

O MODELO EXPERIMENTAL DE AXOLOTE *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798) COMO ESTUDO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL E SUAS APLICAÇÕES NAS MEDICINAS VETERINÁRIA E HUMANA: revisão de literatura

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos, como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Juiz de Fora
2023



CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS - UNIPAC

Matheus Kasmiroski Nunes

O MODELO EXPERIMENTAL DE AXOLOTE *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798) COMO ESTUDO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL E SUAS APLICAÇÕES NAS MEDICINAS VETERINÁRIA E HUMANA: revisão de literatura

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos, como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Juiz de Fora
2023

MATHEUS KASMIROSKI NUNES

O MODELO EXPERIMENTAL DE AXOLOTE *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798) COMO ESTUDO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL E SUAS APLICAÇÕES NAS MEDICINAS VETERINÁRIA E HUMANA: revisão de literatura

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Toshio Oshio

Prof. Me. Hugo Vieira Fajardo

Prof^a. Me. Anna Marcella Neves Dias

O MODELO EXPERIMENTAL DE AXOLOTE *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798) COMO ESTUDO DE REGENERAÇÃO TECIDUAL E SUAS APLICAÇÕES NAS MEDICINAS VETERINÁRIA E HUMANA: revisão de literatura

THE EXPERIMENTAL AXOLOTL MODEL (*Ambystoma mexicanum*) AS A STUDY OF TISSUE REGENERATION AND ITS APLICATIONS IN VETERINARY AND HUMAN MEDICINE: review

Matheus Kasmiroski Nunes¹; Leonardo Toshio Oshio²

Resumo:

Introdução: A capacidade de regenerar tecidos lesionados ou perdidos é fundamental para a homeostase e manutenção da vida. A maioria dos animais se recuperam de lesões por meio da formação de cicatrizes, ao passo que alguns animais como é o caso dos urodeles (tritões, axolote e salamandras), o fazem por meio da regeneração, ou seja, recuperação completa de partes e tecidos perdidos. O *Ambystoma mexicanum* apresenta uma excepcional capacidade regenerativa, aliada à facilidade de manutenção e reprodução em laboratório, de modo que tem ganhado destaque como modelo de estudo em medicina regenerativa. **Objetivo:** O objetivo do trabalho foi revisar sobre a regeneração do Axolote e as aplicações da mesma nas medicinas humana e veterinária. **Métodos:** Foi feita uma busca nas bases de dados Pubmed, Scielo, Biblioteca Virtual em Saúde e Google Acadêmico pelos termos “Axolote”, “*Ambystoma mexicanum*”, “Axolotl” e “regeneration”. **Revisão de literatura:** A regeneração do *A. mexicanum* se caracteriza pela formação de um blastema, o qual contém um conjunto de células indiferenciadas, e em algumas horas após o ferimento, o mesmo já é recoberto por epitélio. As vias moleculares e genéticas que coordenam esse processo regenerativo ainda não foram completamente esclarecidas, a utilização do axolote como modelo regenerativo é uma área promissora para pesquisas, e a compreensão das vias moleculares que culminam nesse processo podem ampliar a terapêutica de diversas doenças, por meio do estímulo do processo regenerativo em humanos e outros animais. Foram observados estudos utilizando o axolote como modelo regenerativo no câncer, doenças neurodegenerativas, e ainda cicatrização de feridas, nos quais resultados promissores foram demonstrados. **Considerações Finais:** Ainda se trata de uma área pouco explorada e muitas pesquisas ainda serão necessárias.

Descritores: Axolote, *Ambystoma mexicanum*, regeneração

Abstract:

Introduction: The ability to regenerate injured or lost tissues is fundamental for homeostasis and maintenance of life. The vast majority of animals recover from injuries through the formation of scars, while some animals, such as urodeles

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos – UNIPAC – Juiz de Fora –MG

² Médico Veterinário. Professor do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos de Juiz de Fora – UNIPAC. Doutor

(newts, axolotls and salamanders), do so through regeneration, that is, complete recovery of parts and tissues lost. *Ambystoma mexicanum* has an exceptional regenerative capacity, combined with ease of maintenance and reproduction in the laboratory, so that it has gained prominence as a study model in regenerative medicine. **Objective:** The objective of the work was to review the Axolotl and its applications in the human and veterinary medicines. **Methods:** In view of this, a search was carried out in the Pubmed, Scielo, Biblioteca Virtual em Saude and Google Scholar databases for the terms “Axolotl”, “*Ambystoma mexicanum*”, “Axolotl” AND “regeneration”. **Review of literature:** The regeneration of *A. mexicanum* is characterized by the formation of a blastema, which contains a pool of undifferentiated cells, and within a few hours after the wound it is covered by epithelium. The molecular and genetic pathways that coordinate this regenerative process have not yet been completely clarified, the use of the axolotl as a regenerative model is a promising area for research, and understanding the molecular pathways that culminate in this process can expand the therapeutics of various diseases, through stimulation of the regenerative process in humans and other animals. Studies were observed using the axolotl as a regenerative model in cancer, neurodegenerative diseases, and even wound healing, in which promising results were demonstrated. **Final considerations:** However, it is still a little explored area and much research remains to be done.

Keywords: Axolotl, *Ambystoma mexicanum*, regeneration

INTRODUÇÃO

No organismo, o reparo tecidual ocorre por duas vias principais: pela regeneração, com a recomposição da atividade funcional do tecido e pela cicatrização, caracterizada pelo restabelecimento da homeostasia, porém com perda da atividade funcional e formação de uma cicatriz fibrótica.¹

A habilidade regenerativa é um fenômeno comum em diversos seres vivos. Em grupos de invertebrados, essa capacidade está associada à reprodução assexuada. Contudo, as vias de sinalização que comandam processos regenerativos foram perdidas em grande parte dos vertebrados.¹⁻³

Os anfíbios urodeles (axolote, tritões e salamandras) são os únicos vertebrados com capacidade de regenerar córnea, retina, mandíbula, membros e pequenas secções do coração, dentre outras estruturas complexas do corpo. Dentre estes, os tritões e os axolotes são os anfíbios mais utilizados como modelos de regeneração.^{4,5}

O foco tem sido dado ao estudo das células-tronco e manipulação das mesmas, no intuito de se conseguir novas terapias para diversas doenças.

Entretanto, as aplicações encontradas através dessas pesquisas se mostram complexas, de modo que o reconhecimento dos diversos mecanismos envolvidos no processo de regeneração de animais como o axolote apresenta potencial terapêutico e um nicho de pesquisa para ser esclarecido.^{6,7}

O desenvolvimento de doenças relacionadas à senilidade é raro nesses organismos, ao passo que em humanos e outros animais, a correlação entre envelhecimento e diversas doenças já foi estabelecida. Incluem a estas, a diminuição do metabolismo, da capacidade reprodutiva, aumento da senescência celular e do dano ao DNA, aumento do tempo para curar lesões e aumento da prevalência de diversas doenças como Alzheimer, Parkinson, doenças vasculares, cardíacas e câncer.^{4,8} Ainda apresentam resistência quando expostos cronicamente às substâncias cancerígenas, com indução mais lenta e progressão mais controlada do câncer em comparação com os animais que não podem regenerar.^{9,10}

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi revisar sobre regeneração em Axolote e a aplicação desta nas medicinas humana e veterinária.

MÉTODOS

Foi realizada uma revisão de literatura por meio de busca de artigos de bancos eletrônicos tais quais Pubmed, Scielo e Google Acadêmico. Além disso, foi realizada consulta em livros didáticos e publicações impressas periódicas. Foram selecionados trabalhos de literatura médica e médico veterinária em línguas inglesa e portuguesa, publicados no período de 2001 a 2022.

REVISÃO DE LITERATURA

Reparo tecidual e regeneração

O reparo de lesões é uma condição básica para a manutenção da vida, este pode ocorrer por meio da cicatrização, comum a todos os animais, ou através da regeneração, capacidade restrita a outro pequeno grupo. A cicatrização de feridas é um processo de várias etapas que se inicia com a formação de um coágulo sanguíneo, seguido por um influxo de células

inflamatórias, reepitelização, migração e deposição de matriz extracelular (MEC) por fibroblastos, remoção de detritos celulares, proliferação celular e, finalmente, maturação da pele.⁴ A rápida cicatrização de feridas abertas é crucial para se evitar infecções e outros agravos, contudo este processo culmina com a deposição desordenada das fibras de colágeno e consequente perda de função do tecido cicatrizado.⁸

A regeneração é um processo homeostático que compreende a completa substituição de órgãos ou partes perdidas ou danificadas, caracterizada pela manutenção da função e características originais do tecido regenerado.¹¹ É um processo complexo e finamente regulado, composto por várias etapas, com interação de vias moleculares, celulares e sistêmicas.¹²

A capacidade regenerativa varia consideravelmente entre os membros do reino animal, observada em vários organismos multicelulares. Alguns animais mantêm essa capacidade por toda a vida, enquanto outros perdem em algum momento do seu desenvolvimento.^{12,13} As planárias, platelmintos de vida livre, com sistema nervoso central rudimentar, são capazes de gerar dois organismos completos e independentes após uma secção transversal que as separa em segmentos cranial e caudal.¹⁴ O peixe-zebra pode regenerar o coração, o cérebro e as nadadeiras e as rãs podem iniciar o processo de regeneração em vários órgãos, embora a regeneração seja geralmente imperfeita.¹⁵

Nos mamíferos esta capacidade é restrita, alguns órgãos como o fígado apresentam reduzida capacidade regenerativa, mas no geral, uma lesão leva à formação de uma cicatriz, com deposição de colágeno.¹² Os fetos mamíferos são capazes de regenerar a falange distal dos dedos durante o desenvolvimento, mas essa capacidade é também é perdida ainda dentro da vida intra-uterina.¹⁶

Entre os vertebrados, os anfíbios urodelos apresentam a habilidade regenerativa mais notável, com capacidade de regenerar estruturas complexas, como membros inteiros, córnea, retina, mandíbula, cérebro e pequenas seções do coração.^{4,17}

O *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798), chamado de axolote, que na língua náhuatl, significa “monstro da água”, são nativos dos canais da Cidade do México (lagos Xochimilco e Chalco).¹³ A embriogênese desses

animais leva em média duas semanas, após isso os animais larvais eclodem de seus ovos e nadam livremente, aumentam rapidamente de tamanho e desenvolvem pulmões e membros.^{4,18}

Aproximadamente um ano após a fertilização, os animais se tornam sexualmente maduros, mas mantêm características larvais, como as brânquias.⁴ Eles não sofrem metamorfose em condições naturais, ao passo que completam seu ciclo de vida na fase juvenil, aquática. Uma transformação para a fase adulta pode ser induzida por hormônios tireoidianos exógenos, o que ocasiona uma diminuição da capacidade regenerativa.¹⁶ Ademais, possuem crescimento indefinido, com observável aumento de tamanho ao longo de sua vida.¹³

Na fase adulta, os machos pesam em média 125-130 gramas e as fêmeas cerca de 170-180 gramas. Trata-se de um tetrápode primitivo, com esqueleto calcificado e articulações cartilaginosas, dentes verdadeiros e um sistema olfativo complexo. Apresenta o mecanismo de trocas gasosas com respiração cutânea e pulmonar, com camadas dérmica e epidérmica formadas por tecido conjuntivo frouxo, fibras colágenas e fibroblastos. Embora se encontre em situação de ameaça na natureza, pode ser facilmente criado e reproduzido em laboratório, onde sua expectativa de vida é de cerca de 25 anos^{13,19,20} (Figura 1).

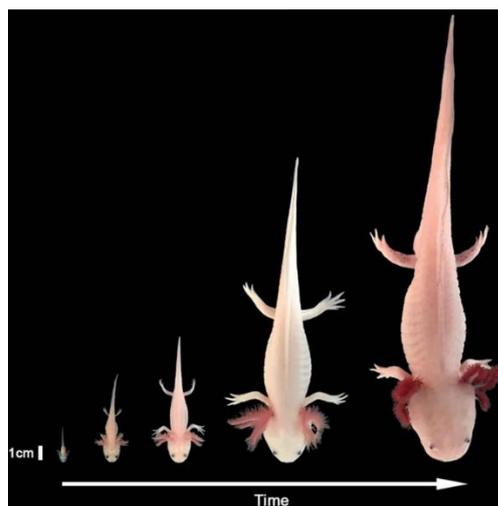


Figura 1 – Fases de desenvolvimento do Axolote. Da esquerda para a direita e na sequência: um axolote filhote (~3 semanas de idade), jovem (~3 meses de idade), jovem tardio (~5 meses de idade), adulto sexualmente maduro (~1 ano de idade) e um adulto de 3 anos de idade.

Fonte: Modificado de Vieira et al.⁴

O potencial de regeneração de uma ampla gama de tecidos e órgãos, juntamente com a curta distância evolutiva em relação aos mamíferos, faz do Axolote um modelo promissor para estudos regenerativos.¹² O mecanismo de regeneração observado em urodelos não promove apenas a diferenciação para células originais dos tecidos, mas garante a restauração de relações fundamentais no reestabelecimento funcional.¹⁷ Ele possui a notável capacidade de regenerar uma grande variedade de tecidos desde o coração, cérebro, brânquias e mandíbula até a cauda e as pernas, sendo estes últimos os mais amplamente utilizados para estudar a regeneração por centenas de anos.^{4,17} Ademais são facilmente criados em cativeiro e foram estabelecidas várias linhagens transgênicas que facilitam esse estudo.²¹

De acordo com dados morfológicos e análise transcriptômica em massa, a regeneração do axolote passa por três estágios distintos: cicatrização de feridas, formação de blastema (desdiferenciação) e redesenvolvimento (padronização).^{12,13,17,20,22} Em algumas horas após a lesão, o epitélio migra e recobre o local da ferida, queratinócitos se multiplicam e formam a capa epitelial apical, e irá concluir a etapa de cicatrização. Nos próximos dias, as fibras nervosas inervam esse epitélio, se estabelece então uma zona de sinalização entre o epitélio e as fibras nervosas. Este centro produz múltiplas moléculas de sinalização que resultam na desdiferenciação e proliferação dos tecidos maduros subjacentes dos membros em células progenitoras dos membros conhecidas como células do blastema, que é um tecido transitório onde as células progenitoras se acumulam antes da regeneração do membro.

As interações na ferida entre as células dos eixos opostos do membro estabelecem o padrão das estruturas ausentes do membro, e uma vez que esse padrão é estabelecido, as células se rediferenciam nas estruturas dos membros ausentes.^{4,8,12,17,19,20,22} As células do tecido conjuntivo podem ser a chave para decifrar o programa molecular de regeneração, uma vez que expressam fatores que orientam a regeneração de partes apropriadas dos membros.⁴

É importante ressaltar que os membros se regeneram no tamanho correto, mantendo o padrão do membro perdido, independentemente do

tamanho ou idade do animal.²³ Todo o membro regenerado é funcionalmente integrado no local do coto original e com todo o corpo (Figura 2).²⁰

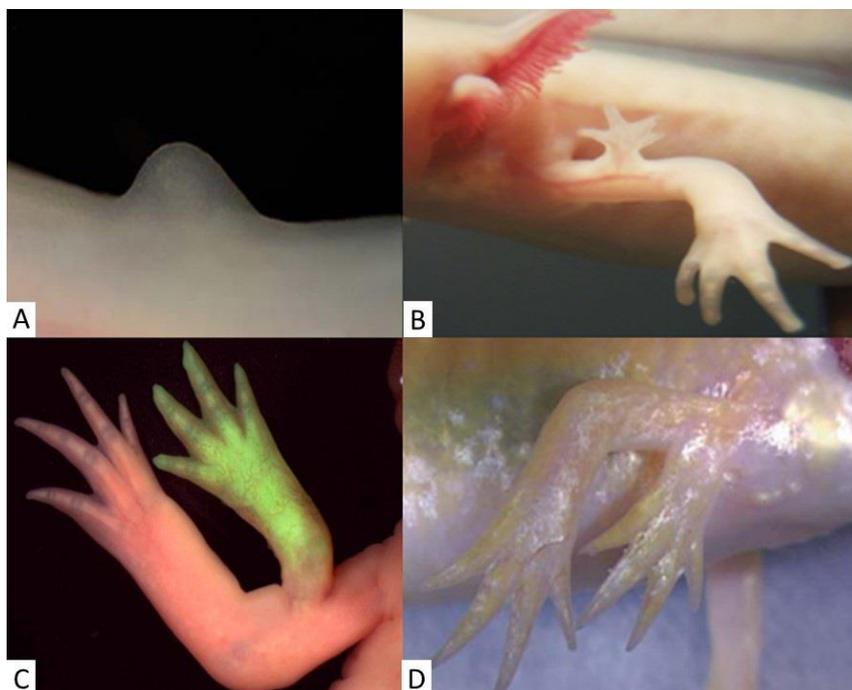


Figura 2 – Processo de regeneração em um Axolote. Em A, início do processo regenerativo. B, formação de nova estrutura por Vieira. C, funcionabilidade da estrutura regenerada. D, término da regeneração.

Fonte: Modificado de Vieira⁴ (A e B); modificado de Sader⁸ (C e D);

Bryant et. al demonstraram que após repetidas secções dos membros estes perdem parte de sua capacidade regenerativa, resultando em membros miniaturizados e com defeitos anatômicos, como ausência de dígitos.

Os processos e vias moleculares acerca de como ocorre a regeneração desses animais ainda não foi totalmente compreendidos. O desafio de entender como induzir e aumentar a capacidade regenerativa em humanos é descobrir quais desses processos falham em humanos e por que falham.⁴

A sinalização mediada por membros da família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é necessária para o desenvolvimento normal dos membros e para a regeneração dos membros na salamandra *Ambystoma mexicanum*.²⁴

Uma via de sinalização bem caracterizada, a via do fator de crescimento transformador beta (TGF- β). É uma importante via de sinalização, pois está ligada à proliferação e migração celular, inflamação e cicatrização e foi descrita

tanto na cicatrização de feridas em mamíferos quanto na regeneração de urodeles. Compreende um grande número de fatores de crescimento polipeptídicos estruturalmente relacionados, capazes de regular uma multiplicidade de processos celulares. O TGF- β e fatores relacionados desempenham um papel proeminente no desenvolvimento, homeostase e reparo de praticamente todos os tecidos em organismos, desde a mosca da fruta até o ser humano.⁸

O envolvimento de diversos genes no processo de regeneração do axolote tem sido proposto, porém a elucidação completa dos genes importantes nesse processo e dos genes regulados negativamente durante a regeneração ainda não ocorreu, e pode ser a chave para se conseguir reproduzir os mecanismos regenerativos em mamíferos.²⁰

O axolote exibe uma incidência baixa de tumorigênese espontânea, com relatos limitados de formação de neoplasias descritos na literatura, principalmente em se tratando de animais jovens.^{10,25-27} Ademais, exibem resistência superior à de outros animais quando expostos à organofosforados e outras substâncias cancerígenas.²⁸ Assim, esses animais podem servir como um sistema modelo nesse contexto, além de fornecer informações sobre os fatores e mecanismos que podem limitar naturalmente a tumorigênese espontânea.⁴

Aplicações do modelo de regeneração

O extrato bruto do Axolote mostrou potencial anticancerígeno contra linhagem celular de leucemia mieloide aguda HL-60, demonstrando atividade antiproliferativa e pró – diferenciação das células HL-60. O entendimento das moléculas responsáveis por esta atividade poderia culminar com a descoberta de um novo tratamento para esta doença.²⁹ Ainda em relação à aplicação do modelo de axolote nos estudos com câncer, extrato de oócitos de axolote foi capaz de reprogramar células cancerígenas de tecido mamário, com consequente supressão do crescimento tumoral à longo prazo.³⁰

A doença renal crônica é outro problema crescente com o envelhecimento, que dispõe de escassas opções terapêuticas. Foi observado que o rim dessa salamandra compartilha semelhanças estruturais, moleculares

e funcionais com os rins de mamíferos, além de possuir a mesma unidade básica, o néfron, o qual foi capaz de regenerar após lesão renal grave induzida por drogas, de modo que a sua regeneração renal poderia ser um modelo interessante para compreender e tratar este problema.³¹

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo causa sintomas de distúrbio do movimento, análogos à doença de Parkinson. Um modelo semelhante ao Parkinson foi desenvolvido em salamandras, onde a ablação específica de neurônios dopaminérgicos foi alcançada usando 6-hidroxi-dopamina. Trinta dias após a ablação os neurônios foram regenerados, sugerindo que o principal processo celular envolvido foi a reativação de células endimogliais da região ventricular que são células GFAP e Sox2+ que amadurecem em neurônios dopaminérgicos para restaurar a área afetada. Deste modo a neuro regeneração das salamandras pode servir como modelo de doenças neurodegenerativas.^{32,33}

Os axolotes também regeneraram uma diversidade de neurônios funcionais, mesmo quando uma região significativa do cérebro foi removida, o que o torna um modelo promissor no tratamento de doenças neurodegenerativas que até o momento apresentam terapêutica limitada (Figura 3).³⁴

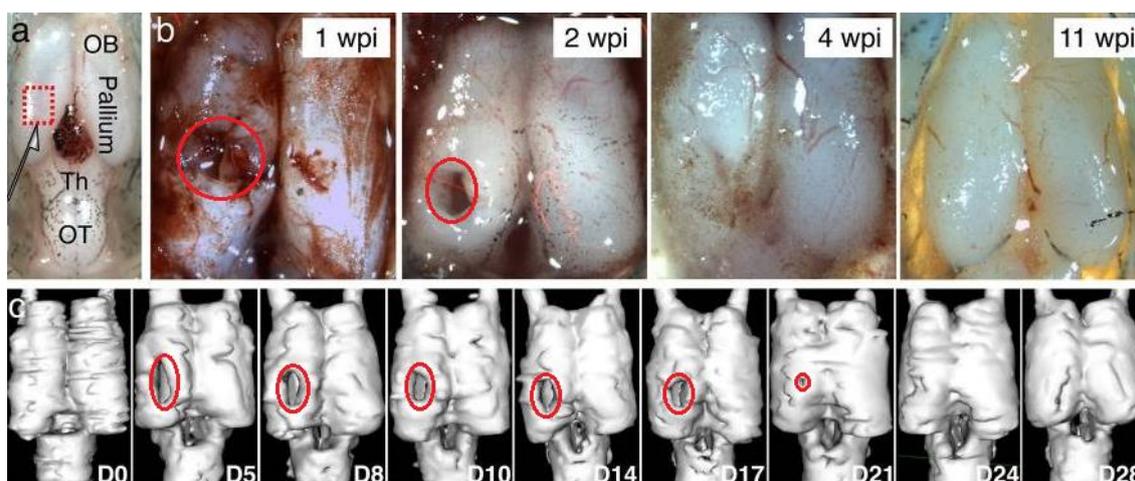


Figura 3 - Em a e b, a localização do local da lesão no pálio dorsal do hemisfério esquerdo do cérebro do Axolote (marcações em vermelho) induzido por lesão mecânica em modelo experimental de regeneração do sistema nervoso central. B Fotografias estereoscópicas representativas de cérebros lesionados em 1, 2, 4 e 11 semanas após lesão (wpi). Em c, Imagens de ressonância magnética *in vivo* de um cérebro de axolote representativo durante um período de tempo de 28 dias após a lesão (marcações) – (D0 – dia antes

da lesão cerebral; D5 a D28 – Dias representativos de 5 a 28 dias após a lesão cerebral, respectivamente).

Fonte: Modificado de Amamoto³⁴

A capacidade regenerativa da medula espinhal também já foi explorada em um modelo de micro lesão cirúrgica, no qual 12 animais submetidos à lesão contusa foram capazes de recuperar completamente o tecido lesionado, o que pode se mostrar útil na compreensão e ampliação do tratamento de lesões medulares produzidas por traumas diversos.³⁵ Nesse sentido, a modulação da expressão gênica para axolote durante a regeneração da medula espinhal foi investigada, foram avaliados 363 genes expressos diferencialmente antes da amputação da cauda e sete dias após, observou-se que em sua maioria os genes foram regulados negativamente e ainda se concluiu que a regulação negativa do sistema imunológico é crucial para a regeneração da medula espinhal.³⁶

Um modelo de infarto do miocárdio induzido por frio lesão, evidenciou a capacidade do axolote de regenerar o tecido cardíaco, este modelo se assemelha ao infarto do miocárdio por isquemia podendo servir para investigar os mecanismos de regeneração miocárdica.³⁷ Em outro estudo, Kochekarov et. al clonaram o RNA de coração fetal humano e o transfectaram para coração mutante de axolote, de modo que o desenvolvimento normal do coração foi restaurado, demonstrado pelo desenvolvimento de batimentos normais e expressão de tropo miosina e miofibrilas organizadas.³⁸



Figura 4 - Alterações morfológicas do coração de salamandra após frio-lesão. A a E Cada painel mostra uma imagem representativa de corações em regeneração nos pontos de tempo indicados após o procedimento. As setas indicam a cicatriz (Week – representam o número de semanas após a lesão).

Fonte: Modificado de Dittrich³⁷

Outra possível aplicação deste modelo seria na regeneração de feridas. A enzima lipoxigenase epidérmica, importante na regeneração do Axolote mexicano, foi extraída desses animais e incorporada em um sistema de nanopartículas de pectina, de modo que sua aplicação melhorou significativamente o processo de cicatrização em ratos, e ainda diminuiu o tempo de fechamento da ferida.³⁹

Diversos outros tecidos que não podem ser recuperados em humanos e demais mamíferos são regenerados pelos axolotes, de modo que o estudo e compreensão dos mecanismos pelos quais esse processo ocorre pode culminar com a ativação ou aumento da expressão de vias moleculares que promoveriam a regeneração em humanos e outros animais.^{37,38}

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora haja muito a aprender sobre como ocorre a regeneração, avanços em medicina regenerativa ajudarão na descoberta de novos tratamentos para condições ligadas ao envelhecimento, nas medicinas humana e veterinária.

Com o conhecimento das vias moleculares da regeneração será possível aumentar as habilidades regenerativas em outros animais, a fim de melhorar a recuperação em lesões agudas e de retardar ou reverter danos do envelhecimento

Entender a regeneração e como esta pode ser estimulada é um promissor campo para pesquisa, ainda há muito para se estudar, mas esta pode ser a chave para o tratamento de diversas afecções que até o momento possuem um limitado arsenal terapêutico.

REFERÊNCIAS

1. Daniel ACS, Athanazior A. Estratégias de regeneração em anfíbios urodelos. *Ci. méd. biol.*, 2006; 5 (2): 160-70.
2. Balbino CA, Pereira LM, Cur R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Cienc Farm.* 2005; 41(1): 28-50
3. Rao N, Jhamb D, Milner DJ. Proteomic analysis of blastema formation in regenerating axolotl limbs. *BMC Biol.* 2009; 7 (83): 1-25.

4. Vieira WA, Wells KM, McCusker C.D. Advancements to the Axolotl Model for Regeneration and Aging. *Gerontology*. 2020; 66 (3):212–22.
5. Vieira WA, Wells KM, Raymond MJ, De Souza L, Garcia E, McCusker CD. FGF, BMP, and RA signaling are sufficient for the induction of complete limb regeneration from non-regenerating wounds on *Ambystoma mexicanum* limbs. *Dev Biol*. 2019 ;451(2):146–57.
6. Vieira WA, McCusker CD. Hierarchical pattern formation during amphibian limb regeneration. *Biosystems*. 2019; 183 (1): 1-41.
7. McCusker C, Gardiner DM. The axolotl model for regeneration and aging research: a mini-review. *Gerontology*. 2011;57(6):565–71.
8. Sader F, Roy S. *Superfamília Tgf-β e regeneração de membros: Tgf-β para iniciar e Bmp para terminar*. *Developmental Dynamics*. 2021; 251(6): 973-87.
9. Suleiman S, Suleiman S, Schembri Wismayer P, Calleja Agius J. The axolotl model for cancer research: a mini-review. *J BUON*. 2019; 24(6): 2227-31.
10. Roy S, Gatien S. Regeneration in axolotls: a model to aim for. *Experimental Gerontology*. 2008; 43(11): 968-73.
11. Oktem EK, Demir U, Yazar M, Arga KY. Three candidate anticancer drugs were repositioned by integrative analysis of the transcriptomes of species with different regenerative abilities after injury. *Computational Biology and Chemistry*. 2023; 106(1): 1-22.
12. Bölük A, Yavuz M, Demircan T. Axolotl: A resourceful vertebrate model for regeneration and beyond. *Developmental Dynamics*. 2022; 251(12):1914-33.
13. Bryant DM, Sousounis K, Farkas JE, Bryant S, Thao N, Guzikowski AR, et al.: Repeated removal of developing limb buds permanently reduces appendage size in the highly-regenerative axolotl. *Dev Biol*. 2017; 424:1–9.
14. Roy S, Lévesque M. Limb Regeneration in Axolotl: Is It Superhealing?. *TSW Development & Embryology*. 2006; 6(1):12-25.
15. Saito, Koki Nishimura, Aki Makanae, Akira Satoh, Fgf- and Bmp-signaling regulate gill regeneration in *Ambystoma mexicanum*, *Developmental Biology*. 2019; 452 (2): 104-13.
16. Simon A, Tanaka E. M. Limb regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2012; 2(2):291–300.
17. Dos Santos AC, Athanazio DA. Estratégias de regeneração em anfíbios urodelos. *R. Ci. méd. biol*. 2006; 5(2): 160-70.
18. Gresens, J. An Introduction to the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Lab Anim*. 2004; 33(9): 41–7.
19. Bothe V, Mahlow K, Fröbisch NB. A histological study of normal and pathological limb regeneration in the Mexican axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*. 2021; 336(2): 116– 28.
20. Haas BJ, Whited JL. Advances in Decoding Axolotl Limb Regeneration. *Trends Genet*. 2017; 33(8): 553-65.

21. Arenas-Gómez CM, Delgado J. Limb regeneration in salamanders: the plethodontid tale. *Int. J. Dev. Biol.* 2021, 65(4): 313-21.
22. Gerber T, Murawala P, Knapp D, Masselink W, Schuez M, Hermann S, Gac-Santel M, Nowoshilow S, Kageyama J, Khattak S, Currie JD, Camp JG, Tanaka EM, Treutlein B. Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. *Science.* 2018; 362(6413): 1-11.
23. Maden M. Axolotl/newt. *Methods Mol. Biol.* 2008; 461(1): 467-80.
24. Glotzer GL, Tardivo P, Tanaka EM. Canonical Wnt signaling and the regulation of divergent mesenchymal Fgf8 expression in axolotl limb development and regeneration. *Elife.* 2022; 31(11): 1-21.
25. Harshbarger J, Chang S, DeLanney L. Cutaneous mastocytomas in the neotenic caudate amphibians *Ambystoma mexicanum* (axolotl) and *Ambystoma tigrinum* (tiger salamander). *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999; 125(3-4): 187–92.
26. Shioda C, Uchida K, Nakayama H. *Pathological Features of Olfactory Neuroblastoma in an Axolotl (Ambystoma mexicanum).* *Journal of Veterinary Medical Science.* 2011; 73(8): 1109–11.
27. Menger B, Vogt PM, Jacobsen ID, Allmeling C, Kuhbier JW, Mutschmann F, Reimers K. Resection of a Large Intra-Abdominal Tumor in the Mexican Axolotl: A Case Report. *Veterinary Surgery.* 2010; 39(2): 232–3.
28. Robles-Mendoza C, Zúñiga-Lagunes SR, Ponce de León-Hill CA, Hernández-Soto J, Vanegas-Pérez C. Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication to motor activity. *Aquat Toxicol.* 2011;105(3-4):728-34.
29. Suleiman S, Di Fiore R, Cassar A, Formosa MM, Schembri-Wismayer P, Calleja-Agius J. Axolotl *Ambystoma mexicanum* extract induces cell cycle arrest and differentiation in human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Biologia Tumor.* 2020; 42(9): 1-10.
30. Allegrucci C, Rushton MD, Dixon JE, Sottile V, Shah M, Kumari R et al. Epigenetic reprogramming of breast cancer cells with oocyte extracts. *Mol Cancer.* 2011; 10(7): 1-14.
31. Chen L, Li J, Ou Y, Kang M, Deng J, Wang Y et al. The axolotl kidney: a novel model to study kidney regeneration. *Kidney Int.* 2023; 104(3): 599-604.
32. Paróquia CL, Beljajeva A, Arenas E, Simon A. Mesencephalic dopaminergic neurogenesis and behavioral recovery in a salamander injury-induced regeneration model. *Desnv.* 2007; 134 (15): 2881–7.
33. Habermann B, Bebin A, Herklotz S, Volkmer M, Eckelt K, Pehlke K. " An *Ambystoma mexicanum* EST sequencing project: analysis of 17,352 expressed sequence tags from embryonic and regenerating blastema cDNA libraries". *Genome Biol.* 2004; 5(9): 1-19.
34. Amamoto R, Huerta VG, Takahashi E, Dai G, Grant AK, Fu Z, Arlotta P. Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *Elife.* 2016; 9(5):1-22.

35. Thygesen MM, Guldbæk-Svensson F, Rasmussen MM, Lauridsen H. Contusion Spinal Cord Injury via a Microsurgical Laminectomy in the Regenerative Axolotl. *J. Vis. Exp.* 2019; 152(1):1-11.
36. Demircan T. Dissecting the Molecular Signature of Spinal Cord Regeneration in the Axolotl Model. *Cureus.* 2020; 12(2): 1-8.
37. Dittrich A, Lauridsen H. Cryo-injury Induced Heart Regeneration in the Axolotl and Echocardiography and Unbiased Quantitative Histology to Evaluate Regenerative Progression. *J. Vis. Exp.* 2021; 171(1): 1-13.
38. Kochegarov A, Moses A, Lian W, Meyer J, Hanna MC, Lemanski LF. A new unique form of microRNA from human heart, microRNA-499c, promotes myofibril formation and rescues cardiac development in mutant axolotl embryos. *J Biomed Sci.* 2013 ;20(1):20.
39. Oveissi F, Tavakoli N, Minaiyan M, Mofid MR, Taheri A. Alginate hydrogel enriched with *Ambystoma mexicanum* epidermal lipoxygenase-loaded pectin nanoparticles for enhanced wound healing. *Journal of Biomaterials Applications.* 2020; 34(8):1171-87.