



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del fotoperiodo en el peso y la talla de

Ambystoma mexicanum

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

Karla Natividad García Cabello

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. María Del Carmen Miñana Solís

2012





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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

García

Cabello

Karla Natividad

5525133954

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

305277091

2. Datos del tutor

Doctora

María del Carmen

Miñana

Solis

3. Datos del sinodal 1

Doctora

María Luisa

Fanjul

Peña

4. Datos del sinodal 2

Doctor

Luis

Zambrano

González

5. Datos del sinodal 3

Doctora

Elsa Guadalupe

Escamilla

Chimal

6. Datos del sinodal 4

Doctora Cecilia

Robles

Mendoza

7. Datos del trabajo escrito

Efecto del fotoperiodo en el peso y la talla de *Ambystoma mexicanum*

39 pp.

2012

CONTENIDO

	Pag
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	
2.1 Ritmos biológicos, importancia	2
2.1.1 Clasificación de los ritmos	3
2.1.2 Ritmos circadianos, características y propiedades generales	3
2.1.3 Organización del sistema circadiano	4
2.1.4 Ritmos circanuales	5
2.2 Fotoperiodo	6
2.2.1 Modelos de fotoperiodismo	6
2.2.2 Crecimiento	7
2.2.3 Fotoperiodo en el crecimiento	8
2.3 Biología general de <i>Ambystoma mexicanum</i>	9
2.3.1 Distribución geográfica y ubicación taxonómica	11
2.3.2 Status biológico de la especie	12
3. JUSTIFICACION	13
4. HIPOTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
6. MÉTODOS	
6.1 Obtención y aclimatación de ejemplares	15
6.2 Fase experimental	16
6.3 Medidas biométricas	17
6.4 Tasa de crecimiento y factor de condición de Fulton	17
6.5 Tasa de crecimiento individual	19
7. RESULTADOS	
7.1 Tratamiento de los datos	20
7.2 Tasa de crecimiento y factor de condición de Fulton	22
7.3 Tasa de crecimiento individual	23
8. DISCUSION	25
9. CONCLUSIONES	32
10. REFERENCIAS	33

FIGURAS	Pag
1. Características de los ritmos biológicos	2
2. Sistema circadiano	5
3. Distribución geográfica de <i>Ambystoma mexicanum</i>	11
4. Esquema del sistema de recirculación y filtrado simple de agua	16
5. Esquema que representa las secciones de los tanques	17
6. Parámetros biométricos	17
7. Incremento en peso, longitud total y longitud patón	21
8. Tasa de crecimiento de juveniles de <i>A. mexicanum</i>	22
9. Pendientes de las relaciones que describen el crecimiento	24
10. Fotoperiodo de la Ciudad de México	28

TABLAS Y FÓRMULAS

1. Fórmula de tasa de crecimiento	18
2. Fórmula de Factor de Condición K	18
Tabla 1. Promedio y errores estándar del factor de condición de Fulton	23
Tabla 2. Ecuaciones lineales	24

RESUMEN

El fotoperiodo como factor climático puede funcionar como una señal de las condiciones ambientales. El fotoperiodismo puede ser definido como la respuesta que presenta un organismo a la duración del periodo de luz y oscuridad en un día. En animales ectotermos como *A. mexicanum* el fotoperiodo es modulador en la regulación del crecimiento y la metamorfosis a través del complejo pineal.

El Axolotl, que en la mitología náhuatl significa “monstruo de agua”, es una especie endémica de la zona lacustre de Xochimilco. El ajolote, *Ambystoma mexicanum*, está catalogado en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie en peligro de extinción. Debido a la condición actual que *A. mexicanum* presenta, el conocimiento y el manejo adecuado de factores físicos, químicos y bióticos es necesario para maximizar el desarrollo, el crecimiento y la reproducción bajo condiciones controladas. Existen diversos factores que pueden limitar o potenciar el crecimiento de *A. mexicanum*, como rasgo fundamental en su historia de vida, siendo el tamaño y no la edad el factor determinante en la supervivencia y en el alcance de la madurez sexual y, por lo tanto, en la reproducción.

El presente trabajo propone al fotoperiodo como una condición de cultivo que podría manipularse para maximizar la tasa de crecimiento en juveniles de los *A. mexicanum*. Los ajolotes fueron expuestos a tres diferentes fotoperiodos, uno cercano al natural LO12:12, uno largo LO18:6 y otro corto LO6:18. La tasa de crecimiento tendió a ser mayor en los ejemplares expuestos a un fotoperiodo LO12:12, que es cercano al natural, aunque no se observaron diferencias significativas entre los fotoperiodos. Los ejemplares expuestos al fotoperiodo cercano al natural mostraron tasas de crecimiento similares entre ellos; en contraste, bajo condiciones que se alejan de las naturales como los fotoperiodos corto y largo se observó mayor variación en la respuesta de los individuos de *A. mexicanum*, lo que sugiere que presentan diferente fotoresponsividad. En contraste es posible que se observara en este trabajo un efecto de fotorefractoriedad y que los fotoperiodos elegidos no sea los críticos.

INTRODUCCION

Ritmos biológicos, importancia

Un ritmo se define como el cambio que se repite con patrón similar, probabilidad y un periodo determinado. Si la variable que cambia es biológica o endógena, se puede hacer referencia a la oscilación que se está observando como un ritmo biológico (Moore-Ede *et al.*, 1982; Aguilar, 1993;). Cuando las variables biológicas presentan un ritmo, se utilizan las siguientes características para describirlo (Figura 1). a) El *periodo* que representa el tiempo que se requiere para completar un ciclo, b) La *frecuencia* que se refiere al número de ciclos que se completan en una unidad de tiempo. c) La *amplitud* es la magnitud de la variación del fenómeno y se estima desde d) la *cresta* que es el punto máximo, hasta e) el *valle* que es el punto mínimo en un ciclo. f) La *fase* generalmente, puede ser vista como cualquier punto incluido de un ciclo, por lo tanto cuando la variable alcanza el punto máximo se le denomina *acrofase* (Gruart *et al.*, 2002)

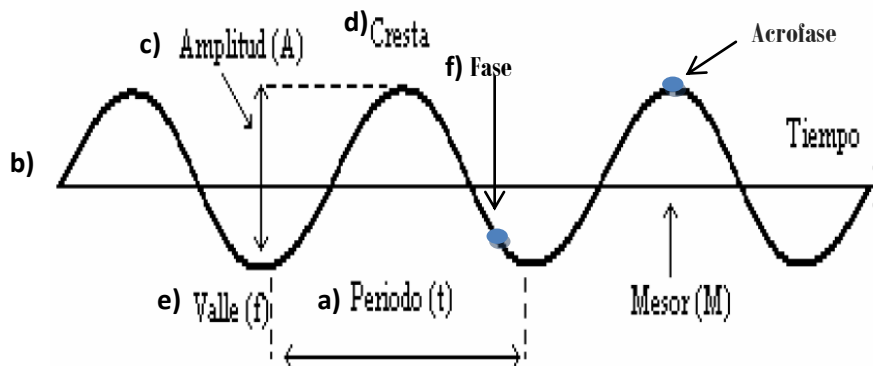


Figura 1. Características de los ritmos biológicos (modificado de Gruart *et al.*, 2002)

Los ritmos biológicos son variaciones cíclicas en las actividades fisiológicas y conductuales que se presentan con cierta periodicidad en todos los organismos, desde bacterias plantas y animales. Las funciones de los organismos se presentan de manera periódica, es decir, tienen un ritmo, en los que existen momentos de máxima actividad y otros donde es mínima o nula (Pittendrigh, 1960), estos patrones cíclicos presentan cierta estabilidad en la naturaleza como los ciclos de presencia y ausencia de luz, ciclos de temperatura, y la presencia de un sistema de regulación capaz de responder a cambios ambientales predecibles que permiten a los organismos realizar de manera

mas eficiente el manejo de energía e incrementar posibilidad de sobrevivencia (Garaulet y Madrid, 2010). En la naturaleza existen cambios predecibles fluctuantes que ocurren con una frecuencia determinada. Se conoce como homeostasis predictiva a la anticipación ante estos cambios fluctuantes que permiten al organismo responder eficazmente suponiendo un menor gasto de energético (Kandel, 1997; Cardinali, 1999).

Los ritmos diarios permiten ordenar algunas actividades según sus limitaciones diarias (por ejemplo en reptiles la termorregulación, en anfibios la humedad) o estrategias particulares para la obtención de alimento, refugio o cualquier tipo de recurso (Tellería, 1987). Por otro lado, los ritmos estacionales influyen en fenómenos específicos como la reproducción o la migración, e inducen bajo condiciones extremas de temperatura hibernación o el letargo cuando la temperatura y disponibilidad de alimento es baja entre otros factores (Tellería, 1987; Willard y Sothorn, 2006).

Clasificación de los ritmos

Los ritmos biológicos se clasifican por su relación con el periodo (o cercanía, del prefijo “*circa*”) que presentan los ciclos geofísicos como:

- Circadiano: cercano a un periodo de un día (24 horas).
- Circanuales: duración de un periodo de 365 días (1 año).
- Circamareales: similar a la duración de las mareas (12.4 h).
- Circalunares: aproximado al ciclo lunar (28 días).

Los ritmos biológicos también suelen clasificarse de acuerdo a la frecuencia con la que se presentan en alta, mediana y baja:

- Ultradianos: periodo \leq 20 horas.
- Circadianos: periodo cercano a 24 horas.
- Infradianos: periodo \geq 28 horas.

(Gruart *et al.*, 2002).

Ritmos circadianos, características y propiedades generales.

Los ritmos circadianos funcionan como referencia para entender a los demás, debido a que son mejor conocidos los mecanismos que los subyacen (Aschoff, 1981). La palabra circadiano se compone de los vocablos latinos “*circa*” (cerca) y “*dies*” (un día).

El ritmo circadiano puede entonces definirse como aquel que se presenta con periodos relativamente cercanos a 24 horas (Pittendrigh, 1981).

Los ritmos pueden ser de tipo exógeno cuando se generan como respuesta a fenómenos ambientales cíclicos, a diferencia de los endógenos que persisten aún en ausencia de algún oscilador ambiental (DeCoursey, 2004; Willard y Sothorn, 2006). Para determinar el origen de un ritmo, se debe mantener al individuo bajo condiciones ambientales constantes de iluminación, es decir en *libre curso*, de tal manera que si persiste, el ritmo será endógeno y si no lo hace, entonces será exógeno (DeCoursey, 2004).

Los ritmos circadianos pueden ajustar su periodo y fase a una señal ambiental cíclica y a esto se le conoce como *sincronización*, dichas señales ambientales cíclicas, reciben el nombre de sincronizadores o “*zeitgebers*” (que en alemán significa “dador de tiempo”) y son capaces de ajustar el ritmo del individuo (Gruart *et al.*, 2002). Existe una gran variedad de sincronizadores, entre ellos, la luz, el alimento y temperatura (principalmente en los poiquilotermos) son los *zeitgebers* más fuertes para ajustar los ritmos circadianos de los individuos (Moore-Ede, 1981; Johnson *et al.*, 2004).

Organización general del sistema circadiano

Las propiedades que distinguen a los ritmos circadianos son: a) poseen un origen endógeno; es decir, que son producidos por un reloj biológico dentro del individuo y que sigue oscilando aún en libre curso, b) cuentan con la capacidad para sincronizarse, ajustándose fácilmente a ciclos ambientales con periodos cercanos a 24 horas y c) son capaces de compensar cambios de temperatura, ya que se mantienen relativamente constantes ante variaciones ambientales de la misma. (Pittendrigh, 1960).

El sistema circadiano se conforma de ciertos elementos para generar el ciclo, sincronizarlo y manifestarlo. En mamíferos el reloj endógeno se localiza en el núcleo supraquiasmático (NSQ) y es el marcapasos principal, aunque existen también osciladores secundarios que reciben conexiones directas desde éste marcapasos principal (Moore-Ede, 1981, García Fernández, 1998). El NSQ, se conecta con tres aferencias principales: Los fotorreceptores de la retina, el tracto retino-hipotalámico (TRH) y las neuronas serotoninérgicas, además de las aferencias que previenen desde

la corteza cerebral, telencéfalo basal, hipotálamo y tallo cerebral (Moore y Leak, 2001). Cuando la información ha sido procesada en el oscilador central, la señal es enviada a células, tejidos y órganos en todo el organismo a través de las vías de salida o eferencias del NSQ que pueden ser de tipo nerviosas u hormonales, las primeras proyectan hacia el hipotálamo anterior y éste hacia órganos efectores. Las eferencias del tipo hormonal se refieren a secreciones glandulares, por ejemplo: la de melatonina, producida por la glándula pineal principalmente, (García-Fernández, 1998). Esta sincroniza diversos ritmos en individuos (Figura 2) (Gruart *et al.*, 2002).

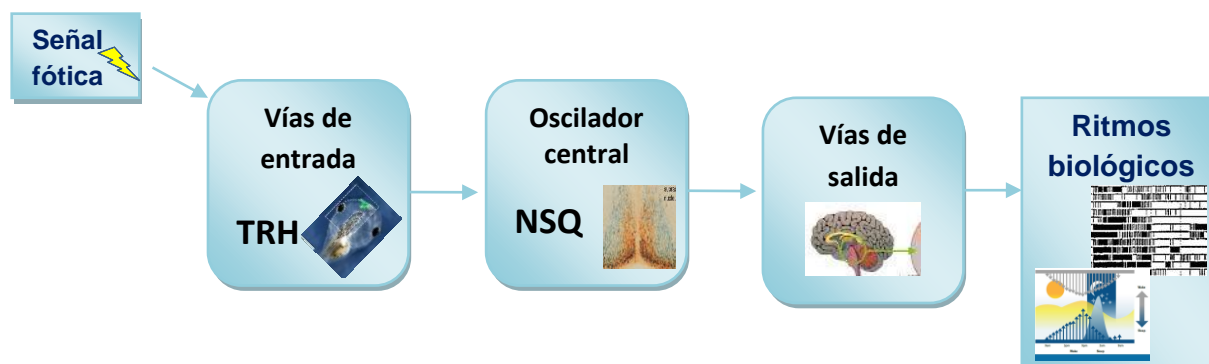


Figura 2. Sistema circadiano que ejemplifica las aferencias, el reloj central y las eferencias.

Ritmos circanuales

Los movimientos de rotación y translación de la Tierra influyen en la sincronización natural de los ritmos circadianos y circanuales. Estas influyen debido a los cambios en la duración y la proporción de luz y oscuridad, por lo tanto los ciclos anuales son indicadores de las estaciones del año y sirven como sincronizadores de diversos ritmos circanuales (Gwinner, 1977a). La periodicidad anual de un gran número de variables persiste aún bajo condiciones ambientales controladas. Los ritmos anuales presentan cierta naturaleza endógena y fue probado en gónadas de pinzones expuestos a LO12:12 durante dos años, donde se mantuvieron en estado de constante reproducción y luego regresaron su patrón anual. El papel del fotoperiodo en la sincronización de los ritmos infradianos ha sido demostrado en estudios con el estornino que muestran o en que trabajan (*Sturnus vulgaris*), (Gwinner, 1977b).

Fotoperiodo

El fotoperiodo se define por la proporción de horas de luz-obscuridad en un ciclo de 24 horas, este como factor climático puede proporcionar información sobre la época del año y sirve a los organismos como una señal de las condiciones ambientales actuales y futuras. La evaluación experimental de la respuesta fotoperiódica suele complicarse debido al tiempo que se requiere para su estudio y a los múltiples factores que intervienen en las respuestas fisiológicas. Sin embargo, para los individuos y a nivel de especie, la correcta respuesta ante el fotoperiodo es el mejor componente de adecuación, en este sentido la temperatura tanto en ambientes templados o polares juega un papel determinante junto con el fotoperiodo al predecir y anticiparse a cambios estacionales, (Bradshaw y Holzapfel, 2007).

Bajo el contexto de los ritmos biológicos, el fotoperiodismo puede ser definido como la respuesta que presenta un organismo a la duración del periodo de luz y obscuridad en un ciclo circadiano. La respuesta fotoperiódica posee tres componentes principales: el fotoreceptor que interpreta la señal fótica, el reloj que mide la señal y el sistema neurosecretor que traduce la señal fótica en secreciones hormonales. El periodo de luz y obscuridad funciona como el sincronizador principal de los ritmos circadianos, lo que implica en los organismos la presencia del sistema fotoreceptor. En mamíferos por ejemplo la región que recibe las señales, se encuentra en los ojos. Sin embargo pueden existir fotoreceptores extrarretinales que al igual que el sistema fotoreceptor retinal, pueden participar en la sincronización fotoperiódica. Se ha encontrado que dichos fotoreceptores extrarretinales localizados en el complejo pineal y el cerebro medio, están relacionados con sincronización fótica en peces y anfibios (Yoshikawa y Oishi, 1998; Oishi *et al.*, 2002).

Modelos de fotoperiodismo

Existen diversos estudios sobre las propiedades del mecanismo que involucran al fotoperiodo y estos han revelado que la mayoría de los organismos utilizan osciladores circadianos para medir la duración del día (Goldman, 2001). Existen dos modelos que postulan que el tiempo de exposición a la luz (como dice el modelo clásico de Bünning), en lugar de la cantidad total de luz es fundamental para la percepción del organismo,

sobre la duración del día. El modelo de coincidencia externa (CE) de medición del fotoperiodo tiene dos papeles distintos y separados: primero, la luz es el mayor sincronizador diurno para la sincronización del sistema circadiano. Segundo, la luz es el sincronizador fotoperiódico para la sincronización del reloj biológico a los cambios a lo largo del día. El modelo postula que la fase fotoinductiva del ciclo circadiano se presenta de forma relativamente continua, lo que permite a los organismos discriminar entre pequeñas variaciones a lo largo del día (Hoffman, 2004). Mientras que el modelo de coincidencia interna (CI) habla de la relación de fase entre dos osciladores circadianos que varía como una función de la longitud del día (Hofman, 2004).

El fotoperiodismo ha sido documentado en rotíferos, anélidos, moluscos, artrópodos, equinodermos, ranas, tortugas, lagartijas, aves y mamíferos (Bradshaw y Holzapfel, 2007). Se ha observado que el tiempo de horas de luz puede acelerar la alimentación en ranas y modular en serpientes de agua dulce el número de puestas. En tortugas al igual que las lagartijas puede cambiar su preferencia térmica, modulando tasas metabólicas dependientes de la temperatura, la tasa de crecimiento y homeostasis térmica (Willard y Sothern, 2006).

Un ejemplo en animales ectotermos donde el fotoperiodo puede interactuar con la temperatura y ser modulador se presenta en la rana, *Xenopus laevis*, en la que se identificaron pigmentos sensibles a la luz llamados melanopsinas, éstos pigmentos se encuentran en los melanóforos de la piel, que siendo sensibles a la luz, se reordenan para generar un cambio fisiológico de color en la piel de las ranas (Provencio *et al.*, 1998).

Crecimiento

El crecimiento es un rasgo fundamental en las historias de vida, siendo el tamaño y no la edad el determinante en la supervivencia y en el alcance de la madurez sexual y por lo tanto, en la reproducción. Es importante destacar que en animales con ciclos de vida complejos como es el caso de los anfibios, la talla y la metamorfosis son componentes importantes para la adecuación (Laurila *et al.*, 2001). El crecimiento se encuentra influenciado de manera considerable por el ambiente.

Existen varios factores que actúan directa e indirectamente en el crecimiento de los organismos, estos pueden ser físicos, bióticos y genéticos. Uno de los factores bióticos que influye en el crecimiento es la disponibilidad del alimento, entre más abundante y de mejor calidad sea, mayor será la talla que pueda alcanzar el individuo y más saludable (Indiviglio, 1997, Lazcano *et al.*, 2011). Los factores ambientales también determinan de manera considerable el crecimiento de los animales: entre los factores físicos que intervienen en el crecimiento, la temperatura es uno de los más importantes debido a que a elevadas temperaturas se favorece el crecimiento de los organismos ectotermos, siempre y cuando éstas se encuentren dentro del rango de tolerancia (Jobling, 1981). La temperatura también es un modulador de la tasa de crecimiento ya que es entre otras cosas, determinante para la secreción de tiroxina por la glándula Tiroides, la cual regula el desarrollo y crecimiento (Kollros, 1961). En general el crecimiento de los anfibios es muy plástico y puede ser afectado por la manipulación de diferentes factores físicos y químicos (Wilbur, 1980). En particular el crecimiento de larvas de anfibios se ve severamente limitado por factores estacionales (Laurila *et al.*, 2001).

Por otro lado, los factores genéticos también son importantes. La tasa de crecimiento de los organismos de una población suele diferir entre ellos; ya que esta variación es un componente importante de la adecuación de cada animal (Stearns, 1992). Las diferencias individuales del crecimiento dan evidencia de la probabilidad de sobrevivencia de los individuos en su ambiente (Sibley y Calow, 1987), de diferentes estrategias de desarrollo o de su ciclo de vida (Kruesi y Alcaraz, 2011), de su potencial reproductivo, la obtención de recursos y de manera integral de su adecuación (Aubin-Horth y Dodson, 2004).

El fotoperiodo y el crecimiento

Tanto el NSC como la glándula pineal son estructuras principales involucradas en la regulación de ciclos anuales. La glándula pineal es un órgano que en varias especies de anfibios, aves, peces teleósteos y reptiles funciona como estructura fotosensorial y responde a cambios ambientales del ciclo luz-obscuridad en condiciones naturales. La glándula funciona entonces como transductor de la información fótica a señales hormonales que coordinan los ritmos circadianos y circanuales con las señales

ambientales, influyendo así en patrones de actividad, termorregulación, crecimiento, metabolismo y la reproducción (Willard y Sothorn, 2006).

El fotoperiodo se ha manipulado en un gran número de especies desde mamíferos, peces (Biswas *et al.*, 2010), reptiles y aves para estimular el crecimiento, se ha reportado que tanto el uso de un fotoperiodo largo como el de un fotoperiodo continuo mejora el crecimiento en varias especies (Saunders *et al.*, 1985; Folkvord y Ottera 1993). La manipulación del fotoperiodo puede también provocar una respuesta de estrés en algunas otras especies, entre ellas la trucha, *Oncorhynchus mykiss* (Leonardi y Klempau, 2003). Sin embargo, aún se requieren estudios para determinar cómo varios patrones de iluminación pueden influir en diferentes aspectos funcionales y conductuales que determinan el crecimiento en diferentes taxa, incluyendo anfibios y reptiles (Lang y Pivorun, 1991).

La glándula pineal en los anfibios regula el crecimiento y la metamorfosis. Por ejemplo, larvas de *Rana temporaria* no llevan a cabo la metamorfosis en obscuridad constante (Milne, 1950). En contraste un fotoperiodo corto (LO1:23, LO6:18) tiene un efecto estimulador en el crecimiento y metamorfosis de *Discoglossus pictus* (Gutiérrez *et al.*, 1984). Dado que los anfibios poseen un complejo pineal bien desarrollado (Binkley, 1979), el presente trabajo propone al fotoperiodo como una condición de cultivo que podría manipularse para maximizar la tasa de crecimiento de *A. mexicanum* bajo condiciones controladas.

Biología general de *Ambystoma mexicanum*



La palabra ajolote proviene del náhuatl “axolotl” que en la mitología náhuatl significa “monstruo de agua”. El ajolote se caracteriza por tener el cuerpo alargado y robusto, una cabeza grande y achatada con ojos de color amarillo iridiscente que carecen de párpados móviles, posee en ambos lados de la cabeza tres branquias externas en forma de abanico. Los adultos cuentan con branquias y sacos pulmonares que llenan al subir a la superficie (Larson *et al.* 2003). El patrón de coloración de ésta especie es oscuro y presenta patrones moteados verdosos o grises (Armstrong *et al.*, 1989; Huacúz, 2004). Las

hembras en general son de mayor tamaño que los machos, la cabeza es de una menor longitud y más ancha (Duellman y Trueb, 1986).

El ajolote pertenece al grupo de animales llamados neoténicos, esto quiere decir que puede retener los caracteres juveniles durante toda su vida y alcanzar la madurez sexual, sin tener que salir del agua, a menos que las condiciones del medio no le sean favorables y sufran metamorfosis (Sever, 2003, Shaffer, 1989). Tanto hembras como machos alcanzan la madurez sexual a partir del año o en su defecto, a los dos o tres años si pasan por el proceso de metamorfosis. Llegan a ovopositar hasta 660 huevos por puesta después de los tres años (Armstrong *et al.*, 1989). La madurez sexual en los organismos es controlada por el eje Hipotálamo-hipófisis-gonadal (Duellman y Trueb, 1986) que a su vez controla la síntesis hormonal (Jorgensen, 1999).

El desarrollo del ajolote es directo, pues no experimenta cambios morfofisiológicos notables que logren marcar diferencia entre el estadio juvenil y el adulto, aunque si presenta maduración de órganos. Como anfibio, el ajolote pone huevos anamniotas que contienen al embrión y al vitelo. El ciclo reproductivo que presentan los ajolotes es anual, principalmente en los meses de enero y marzo, debido a la disminución en la temperatura (Contreras, 2006). La larva desarrolla primero extremidades anteriores y después las extremidades posteriores. Éstas llegan a la etapa juvenil aproximadamente midiendo de 4 a 10 cm de longitud. En el estado adulto pueden medir desde 15 hasta 39 cm de longitud, aunque en México solo se ha registrado un máximo de 33 cm de longitud (Armstrong *et al.*, 1989). Estos animales pasan todo su ciclo de vida en agua muy oxigenada, pues en estadios larvarios es determinante para desarrollo y supervivencia (Valiente, 2006).

Entre otras cosas, el ajolote tiene gran importancia a nivel de investigación, ya que sirve como anfibio modelo en muchos de los procesos fisiológicos y morfológicos del grupo. También presenta características hormonales que han sido estudiadas ampliamente para explicar el proceso regenerativo tan particular que posee (Armstrong *et al.*, 1989).

Distribución geográfica y ubicación taxonómica

El ajolote es una especie endémica de México que presenta distribución limitada a la región del Lago de Xochimilco y Chalco (Figura 3). La distribución se ha restringido debido al rápido crecimiento de la mancha urbana en el Valle de México en las últimas dos décadas, la cual se extendía hasta el Lago de Zumpango y Texcoco (Armstrong *et al.*, 1989).

El ajolote, *Ambystoma mexicanum* (Shaw, 1798) pertenece a la clase de los Lissamphibia, al orden de los Urodela y a la familia *Ambystomatidae* (Larson *et al.*, 2003), la familia más grande de salamandras, poseedora de aproximadamente 33 especies en el continente americano, con una distribución a través de Norte América hasta el límite sur de la meseta central del Valle de México (Sever, 2003).

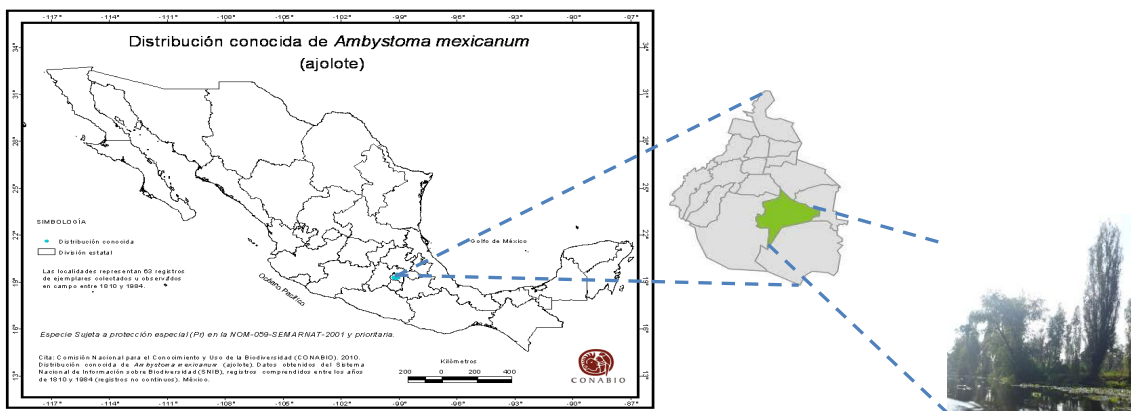


Figura 3. Distribución geográfica de *Ambystoma mexicanum*. Modificado de CONABIO 2010.

La ubicación taxonómica del ajolote de acuerdo a Shaw (1798) es:

Clase: Anfibia

Orden: Caudata

Familia: *Ambystomatidae*

Género: *Ambystoma*

Especie: *A. mexicanum*



Status biológico de la especie

Ambystoma mexicanum está catalogado en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie en peligro de extinción (P) y está incluido en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (DOF, 2010; CITES, 2011), se encuentra amenazado en peligro de extinción por varios factores, como el uso y consumo gastronómico en recetas típicas de la región. Desde la época prehispánica el axolotl o ajolote era apreciado como alimento nutritivo y de buen sabor, era utilizado como terapéutico en enfermedades respiratorias como el asma y la bronquitis. Los habitantes de la zona del valle de México realizan su captura por tradición, y en la actualidad existe la demanda por los acuarios comerciales como especie “rara” (Otto, 1999). Sin embargo, el factor que más influye en la pérdida de la especie es la severa reducción de su hábitat natural, causado por el crecimiento de la urbe, así como el desarrollo tecnológico y agrícola, los cuales contaminan y se apropian de dicho hábitat. Las condiciones ecológicas y sociales en las que está inmerso *A. mexicanum* hacen suponer que sus poblaciones están disminuyendo drásticamente por dos causas fundamentales: a) el aumento excesivo en densidad de especies exóticas, como la carpa (*Cyprinus carpio*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*), lo que afecta directamente su sobrevivencia en estados iniciales y b) la pesca furtiva que está disminuyendo drásticamente a la población de adultos en edad reproductiva (Zambrano *et al*, 2004).

3. JUSTIFICACION

El mantenimiento de factores físicos, químicos y bióticos en niveles adecuados es necesario para lograr el óptimo desarrollo, crecimiento y reproducción (Prosser, 1991). Se han utilizado diversos fotoperiodos para estudiar los efectos sobre las distintas variables biológicas en las cuales los organismos muestran *fotoresponsividad* y conocer entonces el *fotoperiodo crítico* de la especie para determinados parámetros (Kumar, 1997). La manipulación del fotoperiodo en los anfibios ha mostrado resultados controversiales en la modulación del crecimiento (Oishi, 2004). Por lo antes mencionado este trabajo propone el estudio de los efectos del fotoperiodo en el crecimiento de *Ambystoma mexicanum*. Tomando en cuenta la discrepancia que existe, esta tesis propone incrementar el conocimiento de los efectos del fotoperiodo en esta especie que ha sido poco abordada a nivel de ritmos biológicos y de ésta manera ampliar el conocimiento para las condiciones adecuadas en su cultivo.

4. HIPOTESIS

El fotoperiodo influye en el crecimiento de diversos organismos. La proporción de horas de luz-obscuridad a las que los organismos son expuestos durante el día, depende de su distribución latitudinal. *Ambystoma mexicanum* presenta una distribución restringida a una zona con un fotoperiodo ecuatorial (cercano a LO12:12), de manera que si este factor se modifica en relación al existente en su hábitat, se esperaría que como resultado de una fotoresponsividad diferencial se observen cambios en su talla y peso.

5. OBJETIVO

Objetivo general

Conocer el efecto que ejerce el fotoperiodo en la tasa de crecimiento en individuos juveniles de *A. mexicanum*.

6. MÉTODOS

Obtención y aclimatación de ejemplares

Los ejemplares de *Ambystoma mexicanum* de 3 meses y medio de edad se obtuvieron del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuemanco, (CIBAC) de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM- Xochimilco). Los ajolotes se eligieron de la edad antes mencionada, debido a que a partir de ésta, su reloj circadiano es relativamente maduro (Robles, 2011). El periodo de mayor crecimiento en *A. mexicanum* se presenta antes de alcanzar la etapa de madurez sexual al año de vida, por lo que es conveniente trabajar aspectos de crecimiento con organismos en la etapa juvenil.

Los ejemplares se mantuvieron desde la eclosión hasta antes del periodo de aclimatación en condiciones estándar en el laboratorio del CIBAC con la temperatura del agua entre los 17 - 20 °C, un pH de 7-8 y concentración de nitritos > 3 mg/l, durante esta etapa fueron alimentados *ad libitum* con *Daphnia sp.* (pulga de agua). En el periodo de aclimatación, los ajolotes se colocaron al azar en los sistemas experimentales de recirculación de agua y se mantuvieron durante 10 días en fotoperiodo inicial de Luz-Oscuridad (LO) 12:12. La temperatura se mantuvo entre los 17-21°C. Los ajolotes se alimentaron *ad libitum* tanto en la fase de aclimatación como en la experimental con *Tubifex tubifex*, cada tercer día se recogía el *T. tubifex* sobrante y se colocaba alimento nuevo.

Diseño experimental

Los ajolotes se asignaron a tres grupos experimentales con una n=10 para cada uno. Los tratamientos de fotoperiodo asignados a cada grupo experimental fueron los siguientes: control LO12:12, largo LO18:6 y corto LO6:18. Los tanques se mantuvieron en estantes cubiertos con tela ahulada color negro, para controlar la entrada de luz. Los ciclos de luz se controlaron de manera independiente con temporizadores digitales (STEREN, TEMP-08E). La etapa luminosa consistió de luz brillante (250 luxes) que fue proporcionada por una lámpara de luz blanca (Phillips 13 W).

Los estanques fueron acondicionados con un sistema de recirculación de agua provisto de un sistema de filtrado de agua simple (elaborado con guata, carbón activado y tezontle). El sistema de recirculación alimentaba 10 tanques experimentales con entrada de agua y desagüe individual (Figura 4). El flujo del sistema fue de 2000 L/h y la capacidad de 350 L aproximadamente. La tasa de recambio del agua registrada en cada uno de los tanques fue de 60 L/h. Las medidas de los tanques experimentales fueron de 48 x 31 x 20 cm. Cada tanque se dividió en 6 secciones independientes de 15.5 x 16 cm dejando libres las secciones de entrada y salida de agua (Figura 5). Las divisiones se hicieron con malla plástica de macramé (3 mm) para permitir el flujo del agua en todo el tanque. En cada una de estas divisiones fue colocado un organismo.

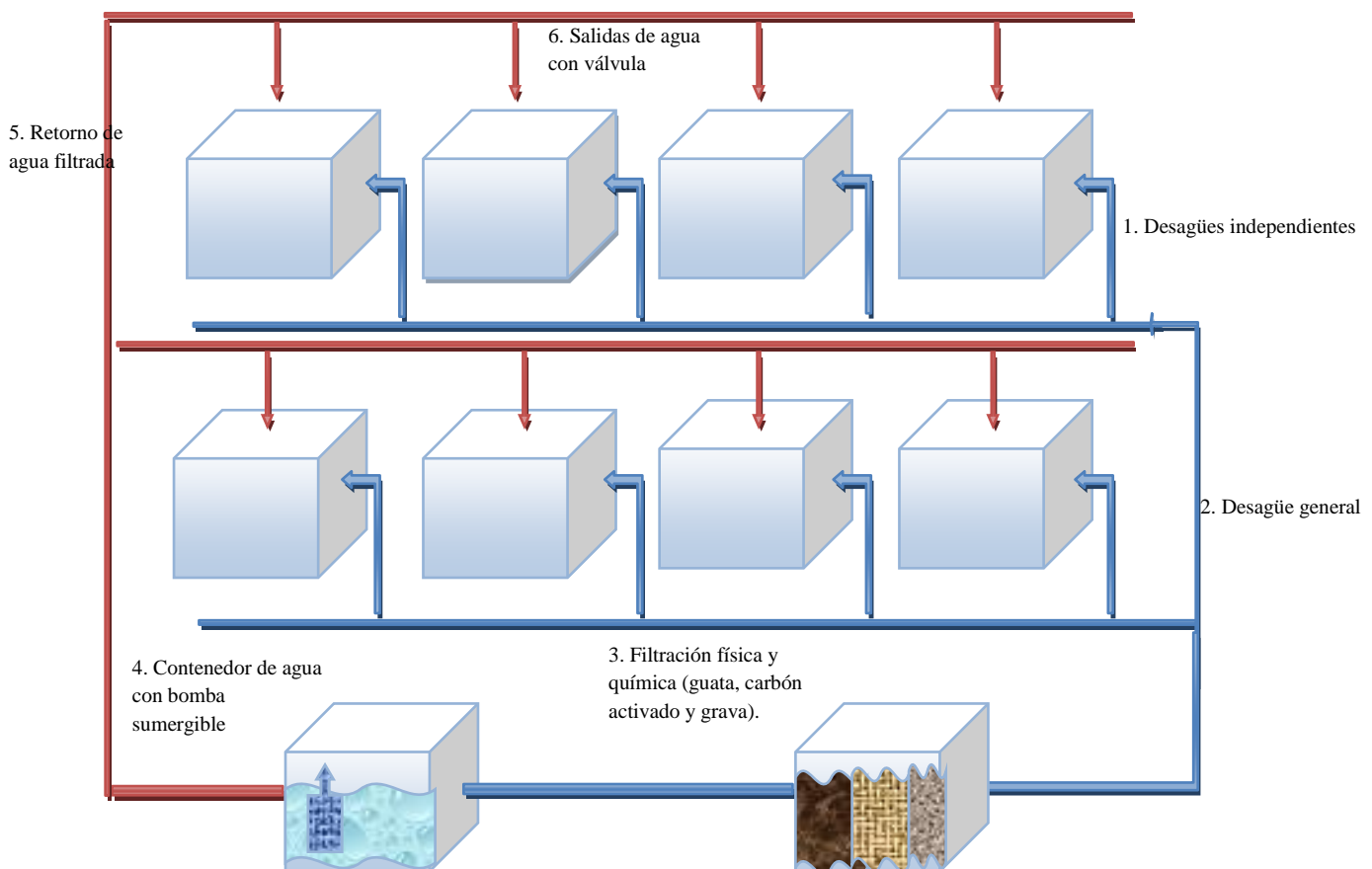


Figura 4. Esquema del sistema de recirculación y filtrado simple de agua.

Las características físicas y químicas del agua se establecieron y mantuvieron de acuerdo a los parámetros reportados como adecuados para la especie (Servín, 2011). La temperatura se registró cada tercer día durante el tiempo del experimento con termómetros de máximos y mínimos manteniéndose entre 17 - 21 °C, el pH del agua se controló en un rango de 7.5 – 8.0, mientras que las concentraciones de nitritos se mantuvieron en 0.5 ± 0.2 mg/l y de amonio total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) < 0.1 mg/l, de igual manera la concentración de cloro fue de 0 mg/l.

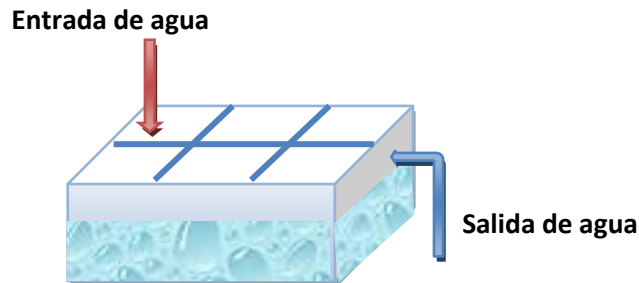


Figura 5. Esquema que representa las secciones en las cuales se dividieron los tanques. Se muestran la entrada y la salida del agua.

Medidas biométricas

El primer registro de medidas biométricas se realizó 10 días después de concluir la fase de aclimatación, cuando los animales cumplieron los 3 meses y medio de edad, los siguientes registros se realizaron cada 10 días. Las mediciones se llevaron a cabo durante un periodo de 50 días que duró el experimento. El peso se evaluó con báscula de 200 g de capacidad (Ohaus Scout Pro). Las medidas tanto de la longitud patrón (LP, distancia del hocico a la cloaca) como de la longitud total (LT) fueron tomadas con un calibrador Vernier digital Truper (Figura 6).

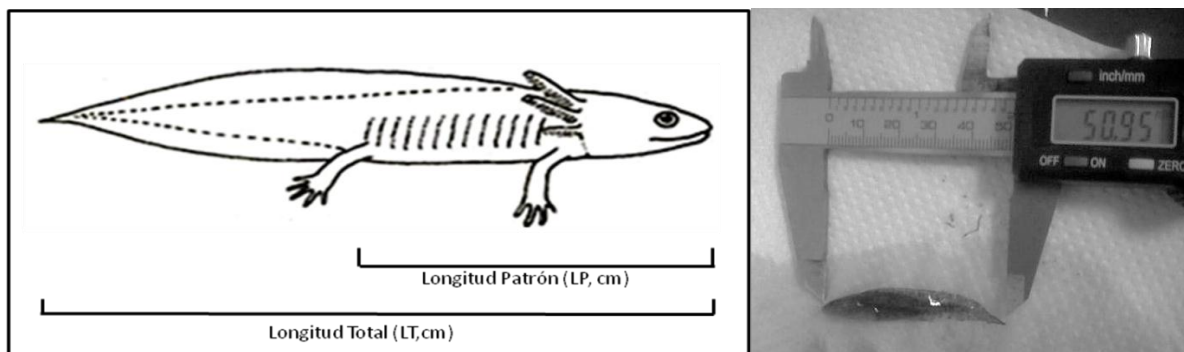


Figura 6. Parámetros biométricos en juveniles de *Ambystoma mexicanum* (Izquierda). (Tomado de López 2012). Calibrador Vernier Digital (Derecha).

Tasa de crecimiento y factor de condición de Fulton.

Al inicio del experimento se realizó una ANOVA de una vía para corroborar que el peso, la longitud total y la longitud patrón entre los grupos eran similares. El incremento en peso y longitud de los ejemplares a lo largo del tiempo se analizó utilizando una prueba de ANOVA de medias repetidas (ANOVA-MR) (Statistica 7). Se probó el supuesto de esfericidad utilizando el índice de Mauchly (von Ende, 1993) y la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilkes para cumplir con los supuestos del ANOVA-MR (Zar, 2010).

La tasa de crecimiento (TC, g/d) de los ejemplares, se calculó usando la fórmula 1, la cual es comúnmente utilizada para estimar la tasa de crecimiento en peces (Busacker, 1990).

Fórmula 1:

$$TC = \frac{(Pf - Pi)}{t} = \frac{\Delta P}{t}$$

Donde:

Pf = peso húmedo final (gramos).

Pi = peso húmedo inicial (gramos).

t = tiempo transcurrido entre el registro del peso inicial y el final.

El factor de condición de Fulton (K) se estimó al inicio y al final del periodo experimental utilizando la fórmula 2 (Busacker *et al.*, 1990). Se realizó una ANOVA de dos vías para conocer las diferencias de K entre el inicio y el final del experimento.

Fórmula 2:

$$K = \frac{PH \times 100}{(LT)^3}$$

(Ricker, 1958)

Donde:

PH = Peso húmedo de los individuos (gramos).

(LT)³ = Longitud total de los individuos (cm).

Tasa de crecimiento individual.

Se calculó la tasa de crecimiento para cada uno de los organismos expuestos a los diferentes fotoperiodos. Ésta tasa de crecimiento individual se estableció como la pendiente de la relación que describe el incremento en peso de los individuos a lo largo del experimento (del día 1 al día 50) utilizando ecuaciones tipo lineal ($y = a + bx$). Las ecuaciones que describen la tasa de crecimiento individual de cada grupo experimental se compararon entre sí utilizando un análisis de covarianza (ANCOVA). Se realizó un ANCOVA para cada tratamiento experimental. El análisis se realizó utilizando el programa Statistica 7.

7. RESULTADOS.

Tratamiento de los datos

Al inicio del experimento los ejemplares de *A. mexicanum* registraron un peso (P) promedio de $3.79 \text{ g} \pm 0.13$ (EE) (error estándar), una longitud total (LT) promedio de $75.65 \text{ mm} \pm 1$ (EE) y una longitud patrón (LP) de $43.41 \text{ mm} \pm 0.52$ (EE). El peso de los ejemplares, así como la longitud total y la longitud patrón al inicio del experimento, fueron estadísticamente similares entre los tres grupos experimentales ($F_{(2,27)} = 0.18, p = 0.83$; $F_{(2,27)} = 0.11, p = 0.88$; $F_{(2,27)} = 0.07, p = 0.92$, respectivamente).

Los ejemplares en los tres grupos experimentales mostraron a lo largo de los 50 días de tratamiento un incremento en P, LT y LP de manera significativa ($F_{(5,48)} = 81.39, p = 0.00$; $F_{(5,48)} = 106.07, p = 0.00$; $F_{(5,48)} = 73.83, p = 0.00$, respectivamente) (Figura 7). Sin embargo entre los tres grupos experimentales (LO12:12, LO18:6 y LO6:18), no se mostraron diferencias significativas en el incremento en peso ($F_{(2,96)} = 1.08, p = 0.34$), Longitud total ($F_{(2,96)} = 0.7, p = 0.50$) y en longitud patrón ($F_{(2,96)} = 0.20, p = 0.81$).

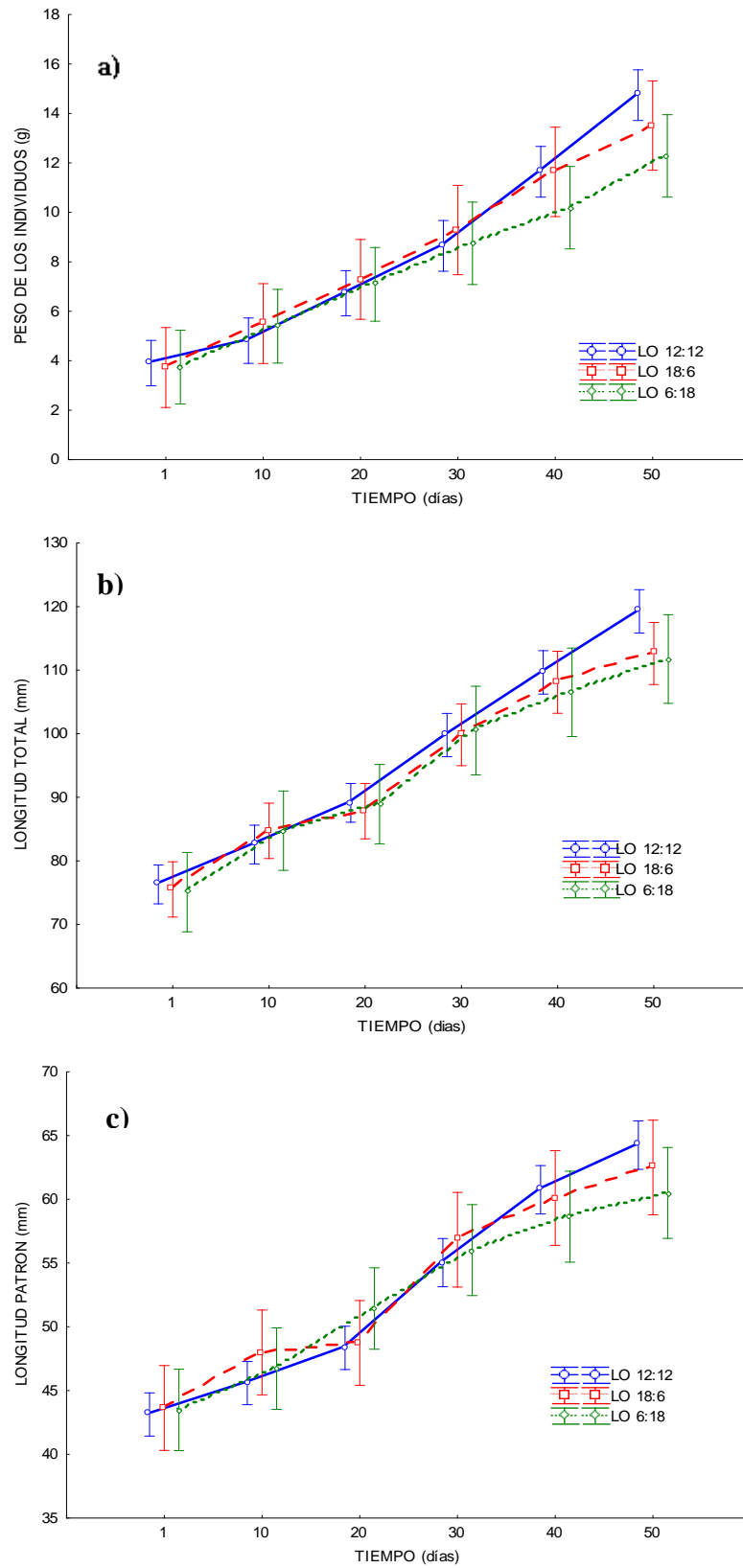


Figura 7. Incremento en peso (a), longitud total (b) y longitud patón (c) de los juveniles de *A. mexicanum* a expuestos a tres diferentes tratamientos de luz-obscuridad (LO) a través del tiempo (días).

Tasa de crecimiento y factor de condición de Fulton

La tasa de crecimiento, medida en gramos por día (g/d) de los ejemplares en los diferentes fotoperiodos, LO 12:12, LO 18:6 y LO 6:18, fue similar, por lo tanto no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos ($F_{(2,25)} = 0.89$, $p = 0.42$). Sin embargo los ajolotes expuestos al fotoperiodo LO12:12 mostraron una tendencia a crecer más que los de los otros dos tratamientos (Figura 8).

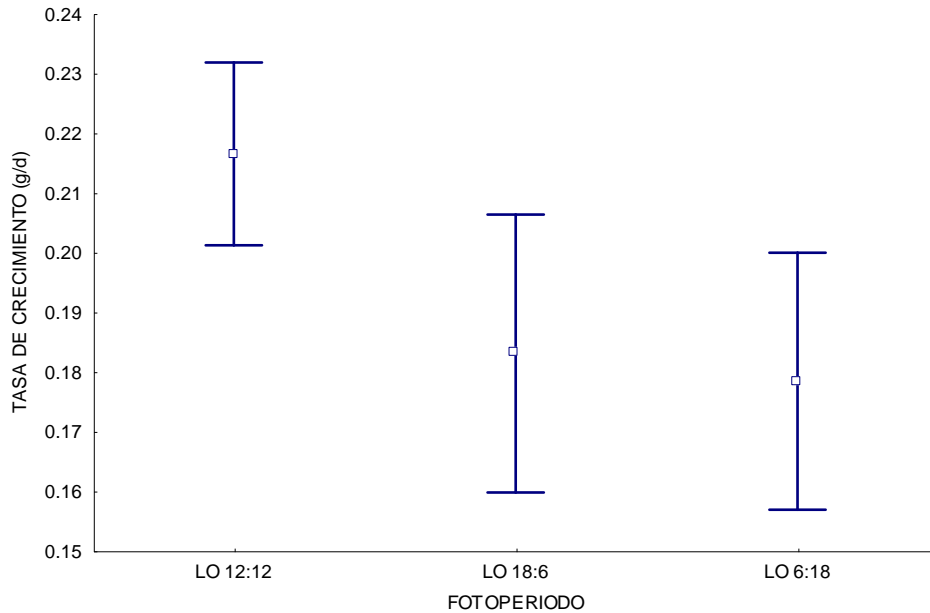


Figura 8. Tasa de crecimiento de juveniles de *A. mexicanum* expuestos a tres diferentes fotoperiodos. Se muestran los valores promedio y sus errores estándar (EE) asociados, en los que se puede observar que no hay diferencias significativas.

Los valores promedio calculados para el factor de condición de Fulton (K) de los ajolotes, tanto al inicio como al final del experimento, se muestran en la tabla 1. El factor de condición de los ajolotes no se modificó en ninguno de los tres fotoperiodos tanto al inicio como al final del experimento. ($F_{(1,54)}=0.14$, $p = 0.86$).

Tabla 1. Promedio y errores estándar (EE) del factor de condición de Fulton (K) de los ejemplares en los tres fotoperiodos.

Fotoperiodo	Inicial		Final	
	Factor de condición K	EE	Factor de condición K	EE
LO 12:12	0.88	± 0.03	0.87	± 0.02
LO 18:6	0.85	± 0.03	0.92	± 0.04
LO 6:18	0.90	± 0.06	0.84	± 0.02

Tasa de crecimiento individual.

El incremento en peso de los individuos a lo largo del experimento (crecimiento) se ajustó a un modelo lineal en todos los casos; en todos los modelos los valores del coeficiente de correlación (R^2) fueron mayores a 0.90, con valores significativos ($p < 0.01$; tabla 2). Las pendientes de la relación que describen el crecimiento en peso de los individuos expuestos al fotoperiodo LO12:12 a lo largo del tiempo fueron similares (ANCOVA; $F_{(2,51)} = 1.0$, $p > 0.05$; Figura 9a); es decir, todos los individuos tuvieron la misma tasa de crecimiento. De igual manera, las tasas de crecimiento de los ajolotes expuestos a un fotoperiodo corto LO6:18, fueron similares entre los individuos ($F_{(2,57)} = 0.02$, $p > 0.05$; Figura 9b). En contraste, en los individuos expuestos a un fotoperiodo largo LO18:6, las pendientes que describen el crecimiento de los ajolotes en el tiempo fueron diferentes ($F_{(2,57)} = 5.2$, $p < 0.05$; Figura 9c); es decir, algunos ajolotes mostraron mayores tasas de crecimiento que otros.

Tabla 2. Ecuaciones lineales que describen la pendiente de la relación del peso de los individuos a lo largo del experimento (tasa de crecimiento). Se muestran las ecuaciones calculadas para cada uno de los organismos experimentales y los parámetros estadísticos de las mismas. Nota: Los valores de R^2 fueron mayores a 0.90, con valores significativos ($p < 0.01$).

Fotoperiodos			
	LO 12:12	LO 18:6	LO 16:18
Ind.	Ecuación	Ecuación	Ecuación
1	TC = 0.18x + 3.97 ($R^2 = 0.99$)	TC = 0.17x + 3.12 ($R^2 = 0.99$)	TC = 0.07x + 3.14 ($R^2 = 0.78$)
2	TC = 0.21x + 2.98 ($R^2 = 0.97$)	TC = 0.21x + 4.69 ($R^2 = 0.97$)	TC = 0.18x + 4.15 ($R^2 = 0.99$)
3	TC = 0.23x + 2.42 ($R^2 = 0.98$)	TC = 0.33x + 4.58 ($R^2 = 0.99$)	TC = 0.18x + 3.41 ($R^2 = 0.99$)
4	TC = 0.26x + 3.40 ($R^2 = 0.96$)	TC = 0.20x + 2.11 ($R^2 = 0.97$)	TC = 0.20x + 3.58 ($R^2 = 0.97$)
5	TC = 0.28x + 2.62 ($R^2 = 0.93$)	TC = 0.15x + 2.95 ($R^2 = 0.98$)	TC = 0.17x + 3.81 ($R^2 = 0.99$)
6	TC = 0.16x + 2.65 ($R^2 = 0.93$)	TC = 0.24x + 3.90 ($R^2 = 0.95$)	TC = 0.21x + 4.57 ($R^2 = 0.99$)
7	*	TC = 0.22x + 4.29 ($R^2 = 0.97$)	TC = 0.18x + 4.27 ($R^2 = 0.98$)
8	*	TC = 0.05x + 3.11 ($R^2 = 0.92$)	TC = 0.20x + 3.17 ($R^2 = 0.90$)
9	TC = 0.20x + 3.18 ($R^2 = 0.92$)	TC = 0.14x + 2.67 ($R^2 = 0.97$)	TC = 0.28x + 2.669 ($R^2 = 0.99$)
10	TC = 0.21x + 2.65 ($R^2 = 0.98$)	TC = 0.12x + 4.12 ($R^2 = 0.96$)	TC = 0.05x + 2.74 ($R^2 = 0.92$)

*Los datos faltantes corresponden a organismos que murieron antes de terminar el experimento.

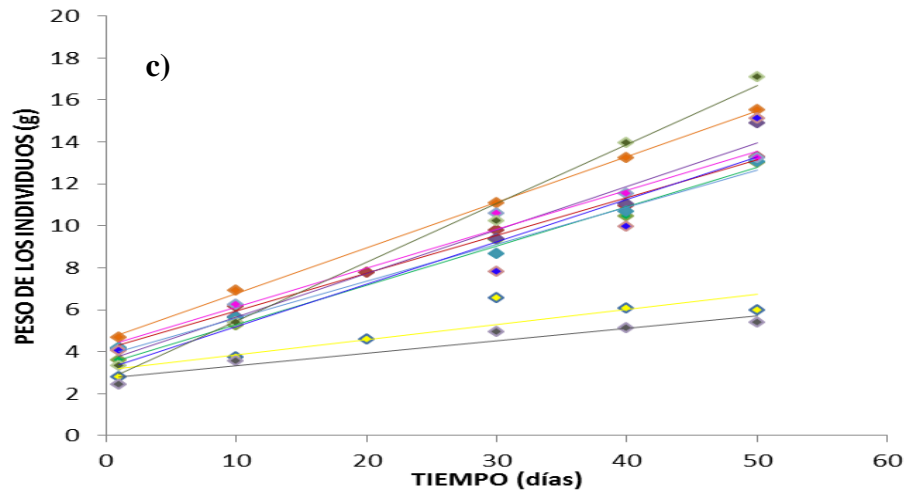
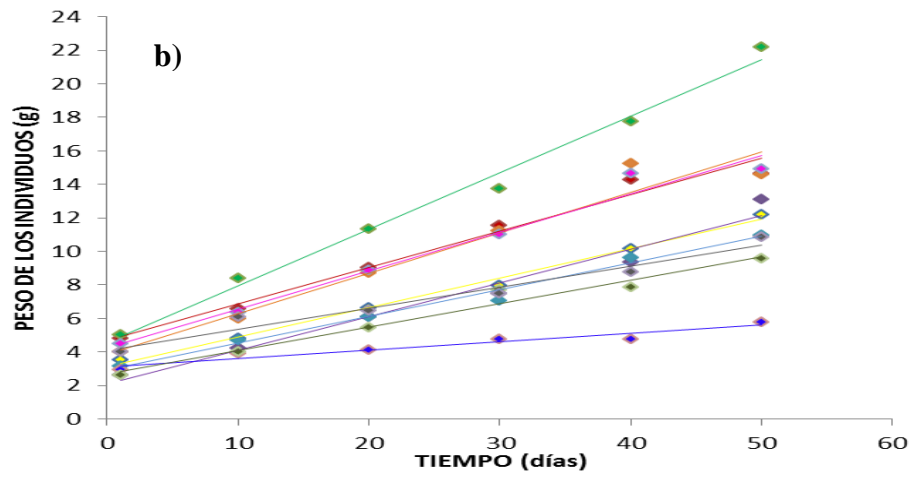
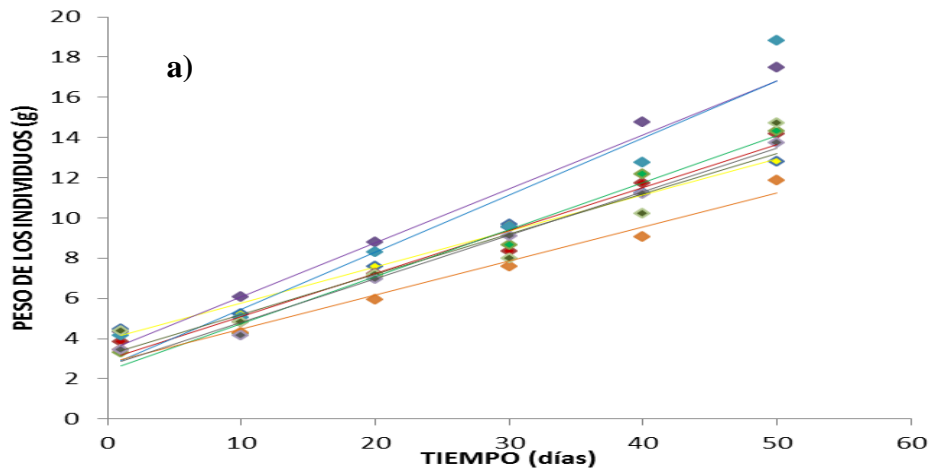


Figura 9. Pendientes de las relaciones que describen el crecimiento (incremento en peso de los ajolotes en el tiempo) de los individuos expuestos al fotoperiodo control LO12:12 (a); largo LO18:6 (b) y corto LO6:18 (c). Cada línea de color representa un individuo diferente.

8. DISCUSIÓN

Los ejemplares de *Ambystoma mexicanum* mostraron un incremento en peso, longitud total y longitud patrón (P, LT y LP) de manera significativa a lo largo del tiempo, ya que se observó un patrón similar en el incremento de estas medidas durante el periodo experimental. Estos resultados contrastan con los reportados para esta especie por Robles-Mendoza y colaboradores (2009) dado que en ese estudio aunque los organismos incrementaron de peso, su longitud total no se modificó de la misma manera, lo cual atribuyen a un efecto protector asociado al canibalismo, pues es común que los ajolotes muerdan la cola de otros individuos, alterando así su longitud real (Gresens, 2004). En este trabajo, los animales permanecieron en contenedores individuales, lo cual parece haber eliminado este tipo de respuesta en los ajolotes.

En el medio natural, el fotoperiodo es una señal ambiental importante que modula la respuesta de los animales ante la variación de los cambios estacionales, incluyendo la tasa de crecimiento (Gwinner, 1986). Los datos obtenidos en este experimento muestran que la tasa de crecimiento obtenida en cualquiera de los tres fotoperiodos utilizados (LO12:12 = 0.20 g/d; LO18:6 = 0.18 g/d y LO6:18 = 0.18 g/d) es mayor que la tasa de crecimiento reportada para juveniles de *A. mexicanum* (0.13 g/d) por Robles-Mendoza y colaboradores (2009). Es probable que la diferencia en la edad de los organismos repercuta en el crecimiento; Robles y colaboradores (2009) utilizan los primeros estadios, mientras que en este estudio se utilizaron animales de 14 semanas. La curva de crecimiento logístico de *A. mexicanum* permite explicar de manera relativa la diferencia en las tasas de crecimiento entre los dos trabajos, pues los ejemplares de éste trabajo se encontraban en una fase de crecimiento lineal.

La relación entre el peso y la talla, es decir, el factor de condición de Fulton (K) se mostró tanto al inicio como al final del experimento, similar entre los ajolotes de los tres grupos experimentales. El factor de condición de Fulton (K) no se mostró afectado por ninguno de los tratamientos experimentales a los que fueron expuestos los ajolotes. Considerando que un valor cercano a $K=1$ del factor de condición refleja el buen estado de los individuos (Busacker *et al.*, 1990), los valores calculados para K, siendo mayores a $K= 80$ indicaron que los ejemplares expuestos a los fotoperiodos LO12:12, LO18:6 y

LO6:18 se mantuvieron en buenas condiciones. Es decir tanto las condiciones fisicoquímicas del agua, como la alimentación y los tratamientos de horas luz fueron adecuados para el buen estado de los ajolotes, lo cual se apoya considerando la alta sobrevivencia de los animales durante el estudio.

Aun cuando los ejemplares mostraron incremento en peso y longitud a lo largo del tiempo, no se observó efecto diferencial del fotoperiodo en estas respuestas. El efecto del fotoperiodo ha sido estudiado en el crecimiento de diferentes especies de anfibios. Por ejemplo, se observó en el sapo africano, *Xenopus laevis*, que el crecimiento incrementa de manera acelerada al ser expuesto a un fotoperiodo de oscuridad constante (Munsey, 1972). Es probable que en este trabajo no se observe un efecto del fotoperiodo en la tasa de crecimiento de los ajolotes debido a los cambios relativamente sutiles de fotoperiodo que usamos en comparación con el usado en otros estudios. Además es probable que el tiempo de aclimatación de los animales a los tres fotoperiodos no haya sido el suficiente para observar un efecto. Lo anterior ha sido reportado por ejemplo en *Hippoglossus hippoglossus* en el cual comienzan a observar los efectos del cambio al fotoperiodo después de 5 meses (Simensen *et al.*, 2000).

A diferencia de otros experimentos, donde se han utilizado condiciones de luz u oscuridad constante para inducir cambios en el crecimiento y el desarrollo en los animales como anfibios y peces (Eichler, 1976; Simensen *et al.*, 2000), en este trabajo, se utilizaron fotoperiodos más moderados (LO18:6 y LO6:18), esto con el fin de comenzar a estudiar las condiciones más favorables para su adecuado cultivo, ya que exponerlos a fotoperiodos completos podría ser un factor estresante que repercutiera en la sobrevivencia. El ajolote es una especie endémica del Valle de la Ciudad de México, donde el fotoperiodo varía muy poco a lo largo del año, por lo que de manera natural no se expone a las condiciones de luz-oscuridad que utilizamos en este experimento (LO18:6 y LO6:18) que están lejos de las condiciones en las que habita, donde las horas de luz no son menos de 10 o más de 13 por día a lo largo del año, éste fotoperiodo a lo largo del año se muestra en la figura 10.

Los organismos bajo condiciones naturales de luz, presentan periodos de 24 horas en metabolismo, desarrollo y conducta (Willard y Sothorn, 2006), exponerlos a condiciones extremas de luz, puede generar alteraciones en todos los sistemas,

incluso incrementar la tasa de mortalidad de otras especies de anfibios como *Rana berlandieri* (datos no publicados). Sin embargo hay especies tolerantes a condiciones ambientales extremas, como el sapo africano *Xenopus laevis* que crece y lleva a cabo la metamorfosis en condiciones de obscuridad constante (Munsey, 1972).

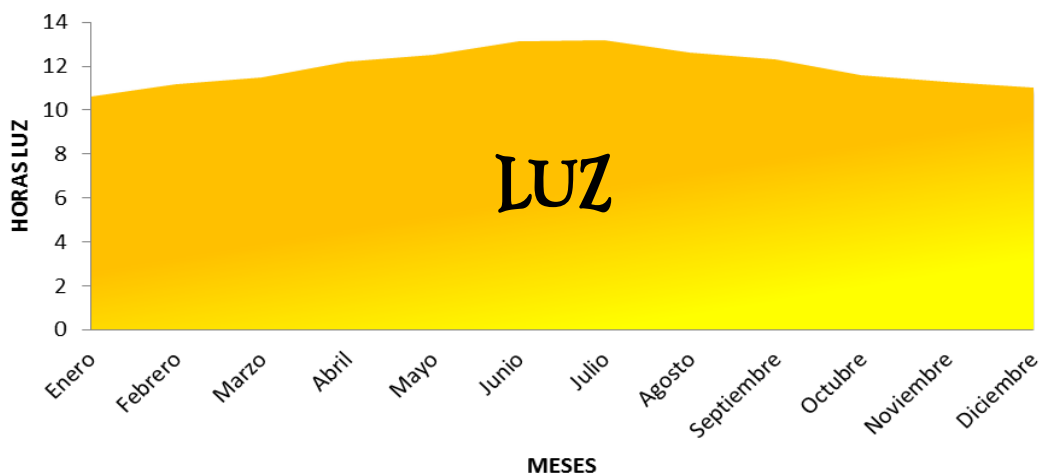


Figura 10. Fotoperiodo de la Ciudad de México a lo largo del año. Datos extraídos de Weather Channel.

En éste trabajo no se observó efecto claro del fotoperiodo en el crecimiento de los ajolotes, sin embargo existe una relativa tendencia de los ejemplares bajo condiciones LO12:12 a mostrar un mayor crecimiento que los ejemplares expuestos a los fotoperiodos LO18:6 y LO6:18. La misma tendencia se observa de manera clara en el incremento en longitud en los tres tratamientos. La tendencia observada hacia un crecimiento mayor de los ejemplares bajo la condición LO12:12 podría asociarse a que los ajolotes son organismos endémicos del Valle de México donde el fotoperiodo que más se ajusta a su condición natural es LO12:12 (Figura 10). Un caso similar se observa en el hipogloso del Atlántico, *Hippoglossus hippoglossus*, donde al ser expuesto a un fotoperiodo similar al natural donde habita en Bergen, Noruega y a un fotoperiodo largo, que se asemeja a las horas luz de su medio natural, la tasa de crecimiento es mas alta que en fotoperiodos cortos (Simensen *et al.*, 2000).

El crecimiento individual de los ajolotes se ajustó a un modelo lineal, esto permitió poder comparar las curvas de crecimiento de manera directa a través de un análisis de covarianza (Allen, 1976). Aunque no existe información al respecto es probable que el crecimiento de *A. mexicanum* después de su eclosión hasta su madurez sexual sea de tipo logístico como sucede en varias especies de peces y anfibios (Semlitsch, 1980). Este supuesto podría apoyarse en las tasas de crecimiento menores a las reportada en este estudio para estadios tempranos de esta especie (Robles-Mendoza *et al.*, 2009). Esto considerando que las curvas de crecimiento logístico describen menores tasas de crecimiento en los primeros estadios (debido al compromiso con procesos de diferenciación de estructuras), las cuales son seguidas de tasas de crecimiento lineales más pronunciadas (Kruesi y Alcaraz, 2011).

La tasa de crecimiento de los ajolotes expuestos al fotoperiodo cercano al natural (LO12:12), fue similar entre los individuos; en contraste, en la condición LO18:6 algunos ajolotes muestran tasas de crecimiento relativamente mayores, mientras que otros muestran menores. Aunque los resultados de este estudio no permiten afirmarlo, es posible que la amplia variación de las tasas de crecimiento entre los ajolotes expuestos a un fotoperiodo largo como LO18:6, respecto a los de uno natural pueda atribuirse a cierta plasticidad fenotípica (Mangel y Stamps, 2001). Es decir, es probable que los individuos muestren diferente expresión en su tasa de crecimiento como respuesta ante distintos periodos de luz y que la sensibilidad sea específica. Las diferencias en las tasas de crecimiento individual entre los ajolotes expuestos a un mismo tratamiento podrían explicarse a través de las llamadas "normas de reacción", las cuales son el conjunto de expresiones fenotípicas de un genotipo ante diferentes ambientes, por lo que diferentes genotipos pueden expresar diferentes fenotipos en respuesta al ambiente (Futuyma, 2005). Lo anterior significa que es probable que los genotipos (en este trabajo los ajolotes como individuos), muestren diferentes tasas de crecimiento dependientes del fotoperiodo, donde en condiciones naturales, es decir, en condiciones LO 12:12, todos los individuos responden de manera similar (Figura 10 a). Mientras que en los fotoperiodos que se alejan de las condiciones en las que habitan como lo son LO18:6 y LO6:18 (Figuras 10b, c), los ajolotes muestran tasas de crecimiento variables. Se han reportado normas de reacción asociadas a diferentes factores ambientales, tales como temperatura (Sprules, 1974; Bizer 1978), densidad (Semlitsch,

987), presencia de contaminantes y otros factores estresantes o de manera general como respuesta a la variación en los recursos disponibles (Stearns 1992; Hentschel, 1999), dichas señales extrínsecas son transducidas en señales endocrinas que controlan las tasas de crecimiento (Denver, 1997; Ryan, 2003), sin embargo no se han reportado normas de reacción relacionadas con diferentes fotoperiodos. No obstante, para demostrar este supuesto se requiere realizar experimentos directamente diseñados para este fin, exponiendo a los mismos organismos de manera secuencial a diferentes fotoperiodos. Aunque sería importante considerar los efectos residuales que van dejando los fotoperiodos precedentes o post-efecto, es decir, la modificación del periodo por efecto de la historia previa (Cardinali, 1994).

La expresión de fenotipos bajo condiciones adversas es importante para la perpetuación de las especies, esto debido a que algunas expresiones pueden estar mejor adaptadas (Hoffman y Parsons, 1997). Las diferencias interindividuales en la tasa de crecimiento pueden ser un componente importante en la adecuación de los individuos (Mangel y Stamps, 2001). De acuerdo a algunos autores, las diferencias individuales en el crecimiento están muy relacionadas con rasgos conductuales individuales, tales como la audacia, la agresividad, la reactividad, los niveles de actividad, entre otros, que influyen en el tipo de respuestas ante una amplia gama de estímulos y situaciones (Sih, *et al.*, 2004). Recientemente se demostró en animales con crecimiento indeterminado, como es el caso de algunos anfibios y reptiles, que las diferencias individuales en la tasa de crecimiento pueden asociarse a la diferente personalidad de los animales debido a los rasgos conductuales individuales (Sih *et al.*, 2003). Es importante señalar que las diferencias individuales en la tasa de crecimiento son consistentes aun cuando los animales se han criado solos con alimento *ad libitum* en ausencia de depredadores, competidores y parásitos (Ragland y Carter, 2004; Martins *et al.*, 2005). Es decir, es probable que mientras que en condiciones de fotoperiodo cercanas a las condiciones naturales todos los individuos se comporten de manera similar, en fotoperiodos alejados de los encontrados en el hábitat los individuos expresen diferentes rasgos conductuales ante el estímulo "novedoso", lo que resultaría en diferentes tasas de crecimiento.

Las variaciones individuales en la tasa de crecimiento de los ajolotes resultan en una mayor dispersión de los datos. Así, es posible que las diferencias en las tasas de

crecimiento entre los individuos de las condiciones LO18:6 y LO6:18 atenúen el efecto del fotoperiodo entre los tratamientos no permitiendo identificar un crecimiento significativamente mayor en el fotoperiodo natural, sino únicamente una tendencia.

La respuesta diferencial de los individuos ante la exposición de los distintos fotoperiodos se relaciona con la “fotoresponsividad”, es decir, la sensibilidad fotoperiódica que presentan. Por el contrario cuando no se presenta una respuesta fisiológica o conductual ante un fotoperiodo determinado se le conoce como “fotorefractoriedad” (Kumar, 1997). Es probable que dicha fotorefractoriedad observada en los individuos de los grupos experimentales LO18:6 y LO6:18, esté relacionada con la aparente pérdida de la capacidad del sistema neuroendocrino para responder ante estímulos fóticos con una fase mas larga o mas corta. Esto sugiere que al exponer a los ajolotes a un fotoperiodo largo como lo es LO18:6 o a uno corto como LO6:18, la respuesta relativamente sincronizada ante la señal fótica se ve afectada.

Por otro lado, los resultados y la teoría de fotorefractoriedad de Kumar (1997) sugieren que los individuos muestran diferente sensibilidad al fotoperiodo en condiciones que se alejan de las naturales. Las diferencias interindividuales en la tasa de crecimiento podrían dar pauta a preguntas relacionadas con las normas de reacción en función del fotoperiodo, lo cual hasta donde sabemos actualmente no ha sido demostrado para ningún grupo de organismos y menos aun para *Ambystoma mexicanum* y de igual manera ampliar perspectivas para ahondar en las características que permiten a los individuos responder o no a los cambios en el fotoperiodo.

CONCLUSIONES

- *Ambystoma mexicanum* mostró un incremento en peso, longitud total y longitud patrón a lo largo del experimento (50 días) en los tres tratamientos.
- Las distintas condiciones de fotoperiodo no ejercieron un efecto diferencial en la tasa de crecimiento de los ajolotes.
- De los tres fotoperiodos utilizados en este trabajo existe la tendencia de que el LO12:12 sea el más adecuado para el crecimiento de los ajolotes.
- Los valores del factor de condición de Fulton (K) reflejaron el buen estado de los individuos, tanto al inicio como al final del experimento, lo que indicó que las condiciones en las que se mantuvieron a los animales durante el experimento fueron adecuadas.
- La tasa de crecimiento individual se diferenció en los ajolotes expuestos al fotoperiodo largo observándose individuos con tasas de crecimiento relativamente bajas y otros relativamente altas. La misma tendencia se observó en los animales expuestos al fotoperiodo corto sin ser estadísticamente diferente.

REFERENCIAS

- Aguilar**, R. 1993. Teorías básicas de los ritmos biológicos, *Psiquis*, 2(6):121-132.
- Allen**, R.L. 1976. Methods for comparing fish growth curves. *Journal of Marine and Freshwater Research*, 10(4): 687-692.
- Armstrong**, J., Malacinski, G., Duhon, S. N. 1989. *Developmental biology of the axolotl*. Oxford University, New York. 320 pp.
- Aschoff**, J. 1981. Freerunning and entrained circadian rhythms. En: Aschoff, J. Ed. *Handbook of behavioral neurobiology. Biological rhythms*. New York. Plenum press 6(4):81-96.
- Aubin-Horth**, N. y Dodson, J. J. 2004. Influence of individual body size and variable thresholds on the incidence of a sneaker male reproductive tactic in Atlantic salmon. *Evolution*, 58(1):136–44.
- Binkley**, S. 1979. Pineal rhythms *in vivo* and *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 64:201-206.
- Biswas**, A. K., Kazushige, I., Takii, K. 2010. Feeding interval and photoperiod influence the growth performance of striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture Research*, 41:517-523.
- Bizer**, J. R. 1978. Growth rates and size at metamorphosis of high elevation populations of *Ambystoma tigrinum*. *Oecologia*, 34(2):175-184.
- Bradshaw**, W. E. y Holzapfel, C. M. 2007. Evolution of animal photoperiodism. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*.38:1-25.
- Busacker**, G. P., Adelman, I. R. y Goolish, E. M. 1990. Growth. Pages 363 – 387 En: Schreck C. B. y Moyle, P. B. (eds). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. 683pp.
- Cardinali**, D. P. 1994. *Introducción a la cronobiología*. Ed. Universidad de Cantabria. España. 58pp
- Cardinali**, D. P. 1999. Ritmos biológicos. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres, J. A. F. McGraw-Hill. Interamericana. México. 1133-1147 pp.
- CITES** - Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora.2011. <http://www.cites.org>

- Contreras, R. E. A.** 2006. Distribución Potencial del *Ambystoma mexicanum* en los canales de la zona chinampera de Xochimilco. Tesis Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. 49 pp.
- De Coursey, P.** 2004. The behavioral ecology and evolution of biological timing systems. En: Chronobiology (biological time keeping). Sinauer Associates. En: Dunlap, J. C., Loros, J. J.(eds) Sunderland Mass. USA. 402 pp.
- Denver, R. J.** 1997. Environmental stress as a developmental cue: corticotropin releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Horm Behav*, 31:169-179
- DOF-Diario Oficial de la Federación,** 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, México, D. F. Marzo 6.
- Duelman, W. E. y Trueb, L.** 1986. *Biology of Amphibians*. Mc Graw-Hill Book Company, New York, NY. 670 pp.
- Eichler, V. B. y Gray, L. S., Jr.** 1976. The influence of environmental lighting on the growth and prometamorphic development of larval *Rana pipiens*. *Dev. Growth Differ.* 18(2):177-182.
- Folkvord, A. y Ottera, H.** 1993. Effects of initial size distribution, day length, and feeding frequency on growth, survival, and cannibalism in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) *Aquaculture*, 114:243-260.
- Futuyma, D. J.** 2005. *Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 603pp.
- Garaulert, M. y Madrid, J. A.** 2010. Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. Department of Physiology, University of Murcia, España. 12 pp.
- García-Fernández, J. M.** 1998. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neurales. En: Manual de Neurociencia. Delgado-García, J.M., Ferrús, A., Mora, F. y Rubia, F. (eds.), Madrid. 778-799.
- Goldman, B. D.** 2001. Mammalian Photoperiodic System: Formal Properties and Neuroendocrine Mechanisms of Photoperiodic Time Measurement. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4):283-301.

- Gresens**, J. 2004. An introduction to the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Lab Animal*. 33: 41-46.
- Gruart**, A., Delgado, J. M., Escobar, C. y Aguilar, R. R. 2002. Los relojes que gobiernan la vida. *La ciencia para todos*. Fondo de cultura económica. México 197pp.
- Gutiérrez**, P., Delgado, J. M. y Alonso-Bedate, M. 1984. Influence of photoperiod and melatonin administration on growth and metamorphosis in *Discoglossus pictus* larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79(2):255-260.
- Gwinner**, E. 1977a. Circannual migrations in bird migration. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 8: 381–405.
- Gwinner**, E. 1977b. Photoperiodic synchronization of circannual rhythms in the European starling (*Sturnis vulgaris*). *Naturwissenschaften*, 64:44.
- Gwinner**, E. 1986. Circannual rhythms. *Zoophysiology*. Springer, Heidelberg, Alemania, 18:154.
- Hentschel**, B. T. 1999. Complex life cycles in a variable environment: Predicting when the timing of metamorphosis shifts from resource dependent to developmentally fixed. *American Naturalist*, 154:549-558.
- Hoffman**, A. A. y Parsons, P. A. 1997. *Extreme environmental change and evolution*. Cambridge University Press, New York. 272pp.
- Hofman**, M. A. 2004. The brain's calendar: neural mechanisms of seasonal timing. *Biological Reviews*, 79:61-77.
- Huacúz**, E. D. del C. 2004. Estado de conservación del género *Ambystoma* en Michoacán, México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. *Ciencia Ergo*, 10(3): 304-308.
- Indiviglio**, F. 1997. *Newts and Salamanders: Everything about Selection, Care, Nutrition, Diseases, Breeding and Behavior*. Ed. Barron's Educational Series, Hauppauge, New York, USA. 128pp.
- Jobling**, M. 1981. Temperature tolerance and the final preferendum—rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *Journal of Fish Biology*, 19(14): 439–455.
- Johnson**, C. H., Elliot, J., Foster, R., Honma, K. y Kronauer, R. 2004. Fundamental Properties of Circadian Rhythms. *En* Dunlap, J. C., Loros, P. J. y DeCoursey.

Chronobiology. Biological Timekeeping. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 406 pp.

Jorgensen, C. B. 1999. Growth and Reproduction. *En*: Feder, M. E. y Burggren, W.W. Environmental Physiology of the Amphibians. University of Chicago Press , Chicago, Illinois. 439-466pp.

Kandel, E. R. 1997. Motivación *En*: Neurociencia y Conducta. Kandel, E.R., Jessell, T.M. y Schwartz, J.H. (eds). Prentice Hall, Madrid. 653-670 pp.

Kollros, J. J. 1961. Mechanisms of amphibian metamorphosis: hormones. *American Zoologist*, 1:107-114.

Kruesi, K., Rosenthal, G. y Alcaraz, G. 2011. Growth and male ornamentation in *Xiphophorus montezumae*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 44(3):159-169.

Kumar, V. 1997. Photoperiodism in higher vertebrates: an adaptive strategy in temporal environment. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35(5):427-37.

Lang, O. E. y Pivouron, E. 1991. The effects of photoperiod and different dosages of melatonin on morphic rate and weight gain in *Xenopus laevis* tadpoles. *General and comparative endocrinology*, 81,28-38.

Larson, A., Weisrock, D. W. y Kosak, K. H. 2003. Phylogenetic systematics of salamanders (Amphibia: Urodela), a Review *En*: Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela Ed. Sever D.M., 1: 31-108.

Laurila, A., Pakkasmaa, S. y Merila, J. 2001. Influence of seasonal time constraints on growth and development of common frog tadpoles: a photoperiod experiment. *Oikos*, 3: 451-460.

Lazcano, D. C. L., Indra, G., Mercado, H. R. 2011. Variación en el crecimiento de juveniles de la cascabel de las rocas *Crotalus lepidus* (Kennicott, 1861) en condiciones de cautiverio. *Ciencia UANL*, Abril-Junio, 162-169.

Leonardi, M. O. y Klempau, A. E. 2003. Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. *Aquaculture*, 221:581–591.

López, P. X. 2012. Detección química y visual de la presencia de un depredador (*Oreochromis niloticus*) en *Ambystoma mexicanum*. (Biólogo)-UNAM, Facultad de Ciencias. México, D.F. 51 pp.

- Mangel**, M. y **Stamps**, J. 2001. Trade-offs between growth and mortality and the maintenance of individual variation in growth. *Evolutionary ecology research*, 3:583-593.
- Martins**, C. I. M., **Schrama**, J. W. y **Verreth**, J. A. J. 2005. The consistency of individual differences in growth, feed efficiency and feeding behavior on African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) housed individually. *Aquaculture Research*, 36:1509-1516.
- Milne**, R. 1950. Influence de la lumiere et de l'obscurite sur la morphogenese. *Med. Arch.*, 25,34.
- Moore**, R. J. y **Leak**, R. K. 2001. Suprachiasmatic nucleus. Pages 141 179. *En: Handbook of behavioural neurobiology: circadian clocks*. Takahashi, J. S., Turek, F.W. y Moore, R.J. Kluwer Academics/Plenum Publisher, New York. 770 pp.
- Moore-Ede**, M. C. 1981. Light: an information source for circadian clocks. *Photochemistry and Photobiology*, 34(2): 237-238.
- Moore-Ede**, M. C., **Zulzman**, F. M. y **Fuller**, C. A. 1982. The clocks that time us. physiology of the circadian timing system. Harvard University Press. Cambridge, 448 pp.
- Munsey**, Larry D. 1972. Salinity tolerance of the african pipid frog, *Xenopus laevis*. *Copeia*, 3:584-58.
- Oishi**, T., **Haida**, Y., **Okano**, K., **Yoshikawa**, T., **Kawano**, E., **Nagai**, K., **Fukada**, Y., **Tsutsui**, K., **Tamotsu**, S. 2002. Deep brain photoreceptors and photoperiodism in vertebrates. *Journal of Photoscience*, 9:5-8.
- Oishi**, T., **Nagai**, K., **Naruse**, M., **Kawano**, E. y **Tamotsu**, S. 2004. Circadian Rhythms in Amphibians and Reptiles: Ecological Implications *Biological Rhythm Research*, 35:105-120.
- Otto**, P. E. S. 1999. Conservación del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) mediante su cultivo y siembra en el Parque Ecológico de Xochimilco. Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J087. México D. F.
- Pittendrigh**, C. S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 25:159-84.
- Pittendrigh**, C.S. 1981. Circadian system: Entrainment. Pages 95-124 *En: Aschoff*, J. *Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms*. New York, Plenum Press. 563pp

- Prosser**, C. L. 1991. Environmental and metabolic animal physiology. Wiley-Liss Inc., New York. 578 pp.
- Provencio**, I., Jiang, G., Degrip, W. J., Hayes, W. P., Rollag M. D. 1998. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Nat Acad Sci. USA*,95: 34–345.
- Ragland**, G.J. y Carter, P.A. 2004. Genetic covariance structure of growth in the salamander *Ambystoma macrodactylum*. *Heredit*, 92, 569-578.
- Ricker**, W. E. 1958: Handbook of computations for biological statistics of fish populations. Fisheries Research Board of Canada Bulletins 7 (3): 247-67.
- Robles**, M. B., 2011. Ritmo circadiano de actividad locomotriz en ajolote juvenil *Ambystoma mexicanum*: sincronización y libre curso, México, D.F. Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Ciencias.
- Robles-Mendoza**, C., García B. C. E. y Vanegas, P. R. C. 2009. Maintenance media for the axolotl *Ambystoma mexicanum* juveniles (Amphibia: Caudata) *Hidrobiológica*, 19(3):205-210.
- Ryan**, T. J., Semlitsch, R. D. 2003. Growth and the expression of alternative life cycles in the salamander *Ambystoma talpoideum* (Caudata: Ambystomatidae). *Biol J Linn Soc*, 80(4):639-646.
- Saunders**, R. L., Henderson, E. B. y Hermon, P. R. 1985. *Aquaculture*, 45:55-66.
- Semlitsch**, R. D. 1980. Growth and Metamorphosis of Larval Dwarf Salamanders (*Eurycea quadridigitata*). *Herpetológica*, 36(2):138-140.
- Semlitsch**, R. D. 1987. Density-Dependent Growth and Fecundity in the Paedomorphic Salamander *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, 68(4):1003-1008.
- Servín**, Z. E. 2011. Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el zoológico de Chapultepec. Tesis de Licenciatura. UNAM. México D.F. 199 pp.
- Sever**, D. M. 2003. Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire. 627pp.
- Shaffer**, H. 1989. Natural History ecology and evolution of Mexican “axolotls”. *Axolotl News Letter*, Indiana University. Axolotl Colony, 18: 5-11.
- Shaw**, G. 1798. *Gyrinus mexicanus* En: Shaw, Naturalist’s Miscellany, 9:343-344.
- Sibley**, R. M., Calow, P. 1987. Growth and resource allocation. *En*: Calow P, editor. Evolutionary physiological ecology. Cambridge: Cambridge University Press. 37pp.

- Sih**, A., Bell, A. y Johnson, C. 2004. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology and Evolution*. 19(7):372-378.
- Sih**, A., Bell, K. L. y Maurer, E. F. 2003. Behavioral correlations across situations and the evolution of antipredator behavior in a sunfish-salamander system. *Animal behavior*, 65, 29-44.
- Simensen**, L. M., Jonassen, T. M., Imsland, A. K. y Stefansson, S. O. 2000. Photoperiod regulation of growth of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 190:119-128.
- Sprules**, W. G. 1974. Environmental factors and the incidence of neoteny in *Ambystoma gracile* (Baird) (Amphibia: Caudata). *Canadian Journal of Zoology*, 52:1545-1552.
- Stearns**, S. C. 1992. The evolution of life histories. Oxford, Oxford University Press. 264 pp.
- Tellería**, J. L. 1987. Zoología evolutiva de los vertebrados. Madrid. 145-155 pp.
- Valiente**, E. L. 2006. Efecto de las especies introducidas en Xochimilco para la rehabilitación del ajolote (*Ambystoma mexicanum*). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM. México D.F., 92pp.
- von Ende**, C.N. 1993. Repeated measures analysis: growth and other time dependent measures. Pages 113–137 *En: Design and analysis of ecological experiments*. Scheiner S.M. y Gurevich, J. (eds). Chapman y Hall, New York. 432pp.
- Wilbur**, H. M. 1980. Complex life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11:67-93.
- Willard**, L. K. y Sothorn, R. B. 2006. *Introducing Biological Rhythms: A Primer on the Temporal Organization of Life, with Implications for Health, Society, Reproduction, and the Natural Environment*. 1st ed. Springer. USA. 656 pp.
- Yoshikawa**, T. y Oishi, T. 1998. Extraretinal photoreception and circadian systems in nonmammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119: 65–72.
- Zambrano**, L., Reynoso, V. H. y Herrera, G. 2004. Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Instituto de Biología. UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO proyecto AS004. México, D.F. 35 pp.
- Zar**, H. J. 2010. *Biostatistical Analysis*. 5ta edición. ed. Prentice Hall. USA. 944 pp.