



Universidad Nacional Autónoma de
México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Análisis morfométrico y alométrico del esqueleto en
desarrollo de *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder,
1798)**

Que presenta:

Eila Anai Márquez Mejía

Que para obtener el título de:

Bióloga

Director de tesis:

Jorge Ricardo Gersenowies Rodríguez



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.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.

A mi institución, la UNAM, por las oportunidades que me ha brindado para lograr mi objetivo de terminar la carrera universitaria, desde el bachillerato hasta el nivel superior.

A mi familia; mi mamá Cristy, mi papá Carlos y mi hermana Carla, por siempre darme su apoyo y motivación a ser una mejor persona.

Al Dr. Jorge Ricardo Gersenowies Rodríguez, tutor de tesis, por brindarme un espacio para desarrollar este proyecto, por todo el aprendizaje que he recibido de su parte, por el gran apoyo, consejos y paciencia. Muchas gracias.

A mis sinodales y profesores durante la carrera, Eduardo Loya, Ariel Olvera, Francisco Cuéllar. Shari Pérez, por tu apoyo en este proyecto y todos los buenos consejos. A ustedes, muchas gracias por brindarme su conocimiento e increíbles momentos en el laboratorio.

A mis amigas incondicionales y compañeras de carrera: Andy, por tu amistad tan única y por siempre estar, Nahombystoma por compartir tantas anécdotas y aprendizaje juntas y Elideth por todos los buenos momentos dentro y fuera de la Facultad.

A mis amigos, Armando, Emma, Luis, Uzi, Jafet, Karina.

Con ustedes, esta etapa de mi vida fue increíble.

La vida en la tierra es más como un verbo. Se repara, mantiene, recrea y supera a sí misma.

- Lynn Margulis

ÍNDICE

Introducción	4
Antecedentes:.....	7
Justificación:	12
Pregunta de investigación	12
Hipótesis	12
Objetivos.....	12
Método	13
– Procedimiento de transparentación (figura 2).....	13
– Procedimiento de obtención de medidas	14
– Procedimiento de análisis alométrico.....	15
Resultados.....	17
Resultados del análisis morfométrico.....	17
Resultados del análisis alométrico	18
Análisis alométrico de las medidas de ancho y largo de las vertebras	19
Discusión	21
Ordenada en el origen valor de r y tipo de alometria	22
Conclusión	24
Referencias.....	25
Apéndice I.....	28
Apéndice II.....	33

INTRODUCCIÓN

Los anfibios son organismos que se caracterizan por la ausencia de aletas pares propiamente dichas, las larvas acuáticas son apodas y algunos órdenes de adultos tienen expansiones dorsales y centrales de la región caudal que se emplean en la natación y quíridios, aletas pectorales y pélvicas pares. La piel de estos organismos puede ser lisa o rugosa y con abundantes glándulas mucosas que permite que se mantenga húmeda, además presentan glándulas parótidas, salivales y lacrimales. Poseen respiración pulmonar; sin embargo hay organismos que mantienen la respiración branquial de las larvas, además, la mayoría de los anfibios presentan respiración cutánea. Son los únicos organismos anamniotas con columela y corazón tricavitario. Presentan una parte de su desarrollo en el agua y otra en la tierra, aunque no es absoluta ni universal (Álvarez, 1980).

Existen tres grupos que se incluyen dentro de los anfibios, los cuales se mencionan a continuación; Anura (sapos y ranas) Caudata (ajolotes y salamandras) y Apoda (cecilias) (Álvarez, 1980).

En el orden Caudata se agrupan anfibios que recuerdan a la forma ancestral. Presentan piel desnuda, sin escamas y ricas en glándulas mucosas. La metamorfosis es poco acentuada ya que la larva es muy similar al adulto; ambas formas tienen dientes en las mandíbulas, ojos sin párpados y el tronco presenta pliegues laterales. Otra característica distintiva que presentan estos organismos, son los tres pares de branquias externas y ramificadas que sobresalen de la porción posterior de la cabeza. En la porción dorsal del cuerpo, presenta una membrana rígida que se prolonga a lo largo de la cola formando una aleta impar y sus patas presentan dedos finos y puntiagudos. (Álvarez, 1980; CONABIO, 2011).

Dentro del suborden *Ambystomoidea* encontramos a la familia *Ambystomidae*, donde el género *Ambystoma* cuenta con el mayor número de especies mexicanas. El ajolote a diferencia de otros anfibios, no presentan metamorfosis, pues estos organismos llevan a cabo un proceso conocido como neotenia, que es la capacidad de alcanzar su madurez sexual y reproducirse sin perder las características larvarias (Álvarez, 1980).

Molina (2018), realizó una investigación sobre el ajolote de Xochimilco, donde los identifica y describe, menciona que dentro del orden Caudata se encuentra la familia

ambystomatidae que es un grupo comúnmente conocido como ajolotes y que está conformada por treinta especies, incluyendo solo un par conocido por su registro fósil, y cuya distribución se circunscribe al continente americano, desde el sur de Alaska, este de Canadá, gran parte de Estados Unidos y ocho estados de la república mexicana, hasta la meseta central. Tienen cuerpos robustos, largos y una cola comprimida.

El ajolote (*Ambystoma mexicanum*) (Figura 1) es un anfibio del orden Urodelo, que pertenece a la familia Ambystomatidae. Su clasificación taxonómica según CONABIO (2011) es la siguiente:

Clase: Amphibia

Orden: Caudata

Suborden: Salamandroidea

Familia: Ambystomatidae

Género: *Ambystoma*

Especie: *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798)



Figura 1. *Ambystoma mexicanum* (Shaw & Nodder, 1798) tomado de https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Ambystoma_mexicanum.001_-_Faunia.JPG

El esqueleto de los organismos de los *ambystomatidae* presenta cráneo plano, los bordes de las órbitas son mucho más estrechos que el ancho máximo del cráneo en las articulaciones cuadrado-articular, lo que da un contorno tendiendo a trapezoidal. En la vista dorsal del cráneo anterior los premaxilares se articulan entre sí medialmente cerrando el borde anterior de la fenestra anterodorsal, el techo craneal y una fenestra anteromedial en el paladar. El dentario en la mandíbula, es el elemento portador de dientes. El premaxilar forma la pared anterior del tabique entre las narinas, pero su extensión lateral se articula con el maxilar formando la mitad medial del borde ventral de la narina. El palatino se osifica. Presentan una articulación de tipo sincondrosis entre la escápula y el cartílago supraescapular. El húmero es significativamente más largo que la ulna y el radio (Jian-Ping, *et al.*, 2018).

En la porción ventral de la cintura pectoral, el precoracoides y el coracoides están completamente osificado formando una placa grande, que se extiende anteroposteriormente y se curva ventromedialmente. En vista lateral, el borde anterior del coracoideo es recto, aunque el borde ventral es redondeado (Jian-Ping *et al.*, 2018).

ANTECEDENTES:

Al realizar una revisión de los trabajos en donde se utiliza como organismo al estudio de *A. mexicanum* se encontró que:

Reilly y Lauder, en 1990 realizan un cuantificación de los cambios morfológicos que ocurren durante la metamorfosis de las salamandras tigre (*Ambystoma tigrinum*) a través de un análisis morfométrico de osteología y miología craneal, con el fin de documentar los patrones de cambio durante este proceso. Realizan un análisis transversal con una muestra de 12 larvas en una etapa ontogenética justo antes de la metamorfosis, 8 organismos justo después de la metamorfosis, y adicionalmente 28 organismos que se encontraban justo en el proceso de metamorfosis. En estas muestras reportan que no había diferencias en el tamaño externo de la cabeza entre los organismos en etapas larvarias con las ya transformadas. El cambio que encuentran es en el aparato hiobranquial, así como el acortamiento de ceratobranquial y basibranquial. El subarcualis incrementó en longitud durante la metamorfosis. También observaron que durante el proceso de transformación el hocico se ensancha, los triángulos maxilar y escamosos rotan posteriomedialmente y el neurocráneo se acorta, lo que resulta en que en general, la longitud del cráneo disminuye durante la metamorfosis. Esto lo relacionan con la morfología funcional de la alimentación en salamandras, pues se refieren a esto como la reorganización morfológica del aparato hiobranquial y los cambios observados en el medio terrestre.

Arntzen (1994) realiza una investigación con salamandras rayadas doradas (*Chioglossa lusitánica*) en donde relaciona alométricamente la longitud de la cola y la longitud corporal de larvas, juveniles y machos y hembras adultos, para lo cual utiliza valores extraídos de diversos datos. Encuentra que la cola aumento de forma no línea con la longitud del cuerpo y en adultos la cola alcanza un crecimiento que frecuentemente excede el doble de la longitud del cuerpo. También indica valores para la frecuencia de autotomía observada, los cuales van del 6% al 33%. Encuentra, además, diferencias entre el índice de la cola y las tasas de autotomía entre distintos estadíos y el sexo de los organismos. Se concluye que la longitud de la cola es un carácter demográfico importante en *C. lusitánica*.

Sheen y Whiteman en 1998 realizan una comparación del tamaño de la cabeza y la longitud del cuerpo de organismos en etapa larval de la salamandra tigre, dado que suponen que el polifenismo trófico es causado por el canibalismo de algunas especies de salamandras. Indican que el morfotipo caníbal de *Ambystoma tigrinum* es más grande a comparación del morfotipo común de la especie. Su hipótesis es que, a partir de un análisis de regresión, encuentren una alometría positiva con cabeza y cuerpos más grandes aunados a organismos caníbales, además que el ancho de la abertura en la articulación de la mandíbula es una determinante importante en el éxito de la búsqueda del alimento. Utilizan 38 morfostipos caníbales y 28 morfostipos típicos, de los cuales los caníbales fueron significativamente más grandes que los típicos.

Anderson y colaboradores (2016) afirman también que la forma de la cabeza juega un papel fundamental en la captura de alimento como en el comportamiento de depredación. Es por eso que examinan diferencias de alometría del ancho de la cabeza y longitud “hocico respiradero” entre tres especies simpátricas de 166 estanques en Missouri E.E.U.U. Encontraron que el ancho de la cabeza y longitud “hocico respiradero” estaba fuertemente relacionada con todas las especies, pero la fuerza de relación variaba entre especies.

Atkins y colaboradores (2020) Describen el desarrollo craneal del *Ambystoma mexicanum* en diferentes estadios, encontraron que la mayoría de los eventos corresponden a etapas que ya han sido establecidas, lo cual crea etapas fácilmente reconocibles del ajolote durante toda la morfogénesis del cráneo, además incluyen etapas que no habían sido identificadas, creando así la primera tabla descriptiva de estadios para el cráneo del *A. mexicanum*.

Vargas-González y sus colaboradores (2005) realizaron una resección ventricular en el corazón de *A. mexicanum*, se evaluó si la restitución del tejido resultado de la hipertrofia o de la hiperplasia por medio de una tinción tricrómica. Los resultados indicaron que el miocardio de *A. mexicanum* recupera su estructura mediante la hiperplasia de cardiomiocitos y sugieren que su capacidad regenerativa es mayor que la reportada para mamíferos adultos (1%), y para otros vertebrados no mamíferos (32%).

Zaballos y colaboradores, (2009) realizaron un manual para explicar la alometría en las especies animales. Se analiza como los organismos modifican su tamaño durante su crecimiento, manteniendo un diseño funcionalmente equilibrado, en donde también se

trata de minimizar las diferentes velocidades de crecimiento entre superficie y volumen lo que permite tener una forma constante. El cambio de tamaños más evidente se da cuando tiene lugar el crecimiento de embriones o larvas. Esto sirve para estudiar como dependen de magnitudes como la energía consumida, superficie corporal, tamaño del cráneo, tamaño de los organismos, etc.

Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayen, (2010) elaboraron una guía de campo de anfibios y reptiles del Valle de Zapotitlán, Puebla, aportando conocimiento sobre la diversidad de especies que no se tenía registradas en la localidad, describen características generales de los anfibios; los adultos son terrestres y presentan pulmones bien desarrollados.

Humphrey (2011) realizó estudios genéticos con embrión, encuentra que un gen mutante, *c* ("cardíaco letal"), causa el fracaso del inicio de la función cardíaca, en corazones de morfología aparentemente normal. El rasgo aparece en aproximadamente en el 25% de los embriones de desove. Las cabezas y branquias de los embriones afectados permanecen pequeñas y se desarrolla una ascitis marcada, eclosionan y muestran movimientos normales de natación y dirección. Mueren a los pocos días después de la eclosión. Los mutantes pueden vivir indefinidamente, sus corazones desaparecen en gran parte o permanecen como parte de una vena. Concluye que el fracaso de la diferenciación normal de estos puede ser consecuencia de la falta de una influencia inductiva por el endodermo relacionado a un efecto inhibitor de algún tipo a partir de esa capa germinal u otras estructuras.

Lee y Gardiner (2012) realizaron un estudio sobre la regeneración de las articulaciones de las extremidades en *A. mexicanum*, utilizando morfología y patrones de expresión de los genes marcadores durante la regeneración conjunta en respuesta a la amputación de un miembro. Utilizaron organismos de un tamaño de 8 a 14 cm que se obtuvieron de la Universidad de California. Se realizaron tres incisiones en la piel que cubre el codo/rodilla, proximal del radio o tibia. Se tiñeron las extremidades con azul del alciano y rojo de alizarina, se utilizó KOH para digerir el tejido. Encontraron, que la región epifisiaria de los miembros anteriores y posteriores se regenera sólo cuando el daño es pequeño, la respuesta regenerativa endógena no es suficiente para regenerar la articulación.

Zierman y Diogo (2013) mencionan que los anfibios son los tetrápodos filogenéticamente más plesiomórficos, e incluyen dos organismos modelo de uso frecuente, *Xenopus laevis* (anuro) y *Ambystoma mexicanum* (caudado). Aportan el primera Informe detallado del

desarrollo del músculo craneal en ajolote desde principios ontogenéticos hasta etapas adultas. Aportan tipos de gradientes morfogénéticos musculares generales en la cabeza: desde anteriores a posteriores, de lateral a medial, y de origen a inserción. Encuentran además que algunos músculos larvarios se vuelven indistintos, contradiciendo que durante la ontogenia la tendencia es principalmente hacia la diferenciación de los músculos.

Pierkaski y colaboradores en 2014 estudian el desarrollo del cráneo de los vertebrados, ya que aún existen muchas características esenciales sin resolverse. Una de esas características es la medida en que la derivación embrionaria de huesos individuales se conserva evolutivamente. Realizan un mapeo de GFP-axolotl transgénico y *Xenopus laevis* para documentar la contribución de crestas neuronales craneales al osteocráneo de los anfibios. Muestran que el patrón axolotl es similar al de los amniotas; probablemente que represente la condición ancestral de los tetrápodos. Aunque el patrón en *Xenopus* es muy diferente.

Quinzio y colaboradores (2015) realizaron investigaciones donde estudiaron los sistemas anatómicos involucrados en la fisiología, tamaño, edad y madurez. Mencionan que una particularidad de las extremidades pelvicas en los anuros es el alargamiento de los tarsos proximales (fibular y tibial). El esqueleto de los miembros y su musculatura están completamente diferenciados en el estadio 42, cuando las osificaciones de los huesos largos están en progreso. Concluyen que el estudio del hueso y cartílago es de suma importancia para estudios del ciclo de vida de estos organismos.

Rivera y sus colaboradores (2015) señalaron que la técnica de diafanización es muy útil para los casos que requiera determinar centros de osificación a partir de especímenes como embriones, fetos y neonatos humanos o de otros animales, debido a que su esqueleto se encuentra en proceso de osificación endocondral y membranosa. Por eso, si se quiere determinar la edad de aparición de los centros de osificación durante el desarrollo embrionario y fetal, la diafanización será la mejor técnica para este objetivo.

Sandoval y sus colaboradores (2016) señalan que la diafanización es una técnica para el estudio osteológico que transparenta los tejidos blandos equilibrando el índice de refracción con su entorno, y donde se tiñen los tejidos esqueléticos para visualizar los componentes óseos y cartilagosos. La posibilidad de la técnica de diafanización ha resultado de gran utilidad, dada su relativa rapidez, para desarrollar estudios de

teratogénesis por citotoxicidad a partir de la comparación de las anomalías congénitas en el desarrollo del sistema óseo en diferentes biomodelos animales.

Requena (2018) estudió el efecto de la morfometría sobre la capacidad de salto de la rana común en cuanto a la longitud y ancho del fémur, longitud y ancho de la tibia y el peso y cómo afecta la asimetría fluctuante a la capacidad de salto. Se midió el número de píxeles que presentaba cada una de las variables morfométricas. Concluyeron que, el nivel de AF que presenta una determinada variable morfométrica es independiente del tamaño de la misma y que el modelo final explica casi la mitad de la variabilidad existente en el salto (49.4%), muestra la gran importancia e influencia que tienen las variables morfométricas, sobre el desempeño locomotor de los anuros.

Thampi y colaboradores, (2018) mencionan que *A. mexicanum* probablemente reduzcan sus extremidades y habilidades mecánicas en relación con las salamandras que viven en la tierra. Aunque incluso como adultos sexualmente maduros, estos anfibios pueden ser inducidos a metamorfosearse en una etapa terrestre de carga de peso por el estrés ambiental o la administración exógena de hormona tiroxina. Afirman que esta transición del axolotl a través de la metamorfosis puede modelar el desarrollo y las fuerzas esqueléticas biomecánicas cambiantes en los mamíferos durante la transición prenatal a postnatal al nacer y en el período postnatal temprano. Compararon los parámetros anatómicos y de expresión génica en tejidos esqueléticos entre axolotls acuáticos y terrestres que tenían la misma edad y genéticamente completos. La longitud de los huesos largos y el área de los huesos cuboides en el esqueleto apendicular, así como los tejidos celulares, cartilagosos e inter-zona de las articulaciones femurotibiales fueron generalmente mayores en los axolotes acuáticos en comparación con sus *hermanos* terrestres metamorfoseados.

JUSTIFICACIÓN:

De acuerdo a la revisión bibliográfica no existe un estudio morfométrico ni alométrico del esqueleto en desarrollo del ajolote *Ambystoma mexicanum*, el cual se pretende contribuir en el presente trabajo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En el esqueleto de las larvas en desarrollo de *Ambystoma mexicanum*:

- ¿Cuáles son las medidas más adecuadas para caracterizar morfométricamente el esqueleto axial?
- ¿Cuál es el tipo de crecimiento alométrico entre diferentes elementos del esqueleto axial?

HIPÓTESIS

Existen índices característicos del esqueleto en desarrollo del ajolote *Ambystoma mexicanum*, los cuales tendrán un coeficiente de variación menor al 20%.

Se obtendrán coeficientes de alometría los cuales se esperan, debido a que los juveniles del ajolote *Ambystoma mexicanum* mantienen una morfología parecida al adulto, serán predominantemente isométricos.

OBJETIVOS

De una serie de esqueletos transparentados de *A. mexicanum* en desarrollo se procederá a realizar lo siguiente:

- a) Determinar y evaluar los índices morfométricos de los elementos esqueléticos axiales más característicos.
- b) Determinar y evaluar los coeficientes alométricos de los elementos esqueléticos axiales más característicos.

MÉTODO

Se utilizaron 169 ejemplares de *A. mexicanum* en diferentes etapas de desarrollo, los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de Herpetología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, siendo estos organismos de desecho.

– Procedimiento de transparentación (figura 2)

Se utilizó la técnica de transparentación y tinción doble según el método de Dingerkus y Uhler (1977) modificada por Gersenowies (comunicación personal). El cual consiste de los siguientes pasos:



Figura 2.-Ruta crítica para obtener las preparaciones de esqueletos transparentados de seguida en el presente trabajo.

- A)** Se enjuagaron con agua corriente durante un día y se colocaron en formol al 4% neutralizado por 24 horas.
- B)** Los organismos se pasaron por un tren de alcoholes (alcohol etílico), para su deshidratación, empezando por una concentración al 40%, seguida posteriormente por soluciones de 60%, 70%, 80%, 90% y 100%. Veinticuatro horas cada uno.
- C)** Se colocaron en solución de azul de alciano al 0.1%, por 24 hrs en obscuridad.
- D)** Se retiró de la solución de azul de alciano se pasaron por el tren de alcoholes en orden inverso, es decir del 100% al 40%, un día en cada solución.
- E)** Los organismos se lavaron en agua corriente durante 24 horas para posteriormente sumergirlos en una solución de rojo de alizarina "S".
- F)** Posteriormente se trasladaron a una solución de hidróxido de sodio al 4% para la digestión de los tejidos blandos, durante 8 semanas.

- G) Se visualizaron al negatoscopio del laboratorio para identificar cuando los organismos se observaran traslucidos, para proseguir al siguiente paso del método, es decir, la diafanización.
- H) Para diafanizar los organismos se colocaron en un tren de glicerina a distintas concentraciones, empezando por glicerina a una concentración de 40%, 60%, 80%, 90% hasta 100%.
- I) Con el procedimiento concluido, los organismos se almacenaron en glicerina pura y se enumeraron para una mejor identificación (se muestran algunos especímenes en diferentes estadios en el apéndice I).

- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE MEDIDAS

Se procedió a tomar fotografías en vista dorsal de todos los organismos.

De los especímenes transparentados se tomaron las medidas de longitud máxima y mínima de todos los elementos esqueléticos que reunieran dos condiciones:

- a) Presentes en todos los estadios
- b) Que se puedan diferenciar por sus relaciones espaciales

Los datos obtenidos se concentraron en una página de excell y posteriormente se exportaron al programa *Statistica ver. 10* para el análisis morfométrico y alométrico.

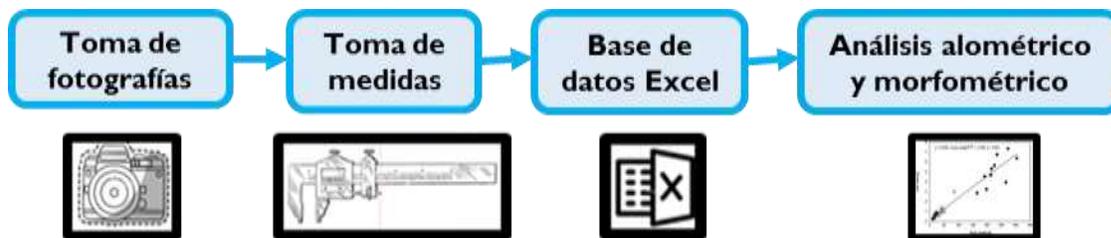


FIGURA 3.- RUTA CRÍTICA DEL PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE DATOS Y DE LOS ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y ALOMÉTRICO.

- PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

1.- En la hoja de cálculo Excel se llevó a cabo el análisis morfométrico, para ello se calcularon los índices morfométricos para eliminar el efecto del tamaño utilizando la fórmula:

$$y = \text{índice de la medida "x"} = \frac{\text{longitud de la medida "x"}}{\text{longitud total}}$$

De cada uno de los índices se obtuvieron el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se considero el siguiente criterio para interpretar los resultados:

C.V. <10% el carácter vario poco, se supone que está bajo fuerte presión de selección.

10%< C.V. < 20% el carácter vario ligeramente, se supone que está bajo presión de selección.

C.V. > 20% el carácter vario mucho, se supone que no hay presión de selección.

2.- Se determino la deformación utilizando la siguiente ecuación:

$$D = \frac{y_{final} - y_{inicial}}{y_{inicial}} \times 100$$

Donde sí: D < 0, se reduce el índice de deformación.

D > 0, se incrementa el índice de deformación.

D = 0, no hay deformación

3.- Se compararon los datos morfométricos utilizando una prueba de "t" para muestras pareadas, donde se contrastaron las siguientes hipótesis:

Ho: D=0, El procedimiento de transparentación no afecta al índice morfométrico de los organismos fijados.

Ha: D ≠ 0, El procedimiento de transparentación afecta al índice morfométrico de los organismos fijados.

– PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS ALOMÉTRICO.

1.- En la hoja de cálculo Excel se llevó a cabo el análisis alométrico, para ello se calcularon los logaritmos de los datos merísticos, con ellos se elaboró una hoja de cálculo la cual se exporto en formato *.txt al programa STATISTICAL versión 10.1.

2.- En el programa STATISTICAL versión 10.1, se llevó a cabo el análisis de correlación para determinar entre cuales medidas se encuentra una relación significativa.

3.- Entre las medidas que poseen un coeficiente de correlación significativo se lleve a cabo el análisis alométrico de acuerdo con el procedimiento descrito por

Gersenowies (2015), determinándose si el comportamiento era alométrico positivo, alométrico negativo o isométrico.

Resultados

RESULTADOS DEL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Al obtener los índices morfométricos tomando como referencia a la longitud total de los organismos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Índices morfométricos con referencia a la longitud total de los organismos.

Índice	Promedio	Des. Estándar	C.V.
Ancho	1,16656	0,4345	37,25
Longitud del morro	0,2574	0,5887	228,69
Longitud posorbital	0,5067	0,1	19,74
Longitud internasal	0,217	0,24406	112,47
Longitud interorbital	0,4459	0,1016	22,8
Longitud orbital (derecho)	0,2929	0,2304	78,64
Ancho orbital (derecho)	0,2188	0,1476	67,46

Se puede observar que muchos índices muestran una variación muy grande, esto puede ser debido a dos motivos, el primero de ellos puede atribuirse a un error sistemático durante la toma de las distintas medidas, y el segundo, a que la longitud total no es la adecuada para la obtención de los índices. Por esta razón, se decidió volver a calcular los índices tomando como medida de referencia a la anchura, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Índices morfométricos con referencia a la anchura.

Índice	Promedio	Des. Estándar	C.V.
Longitud total	0,8858	0,1103	12,45
Longitud del morro	0,1951	0,0904	46,31
Longitud posorbital	0,4429	0,0651	14,71
Longitud internasal	0,1771	0,04	22,61
Longitud interorbital	0,3881	0,0688	17,73
Longitud orbital (derecho)	0,2474	0,061	24,65
Ancho orbital (derecho)	0,1859	0,0451	24,25

En la tabla 2, se indica que los índices morfométricos muestran coeficientes de variación más bajos, esto implica que la anchura es una mejor medida para obtener dichos índices durante el desarrollo del ambystoma.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ALOMÉTRICO

Con respecto a las longitudes craneales, cuando se toma como referencia la longitud total (Tabla 3) se observa que cuatro medidas poseen un comportamiento isométrico, mientras tres poseen un comportamiento alométrico negativo, es decir que conforme crece el organismo poseen una menor longitud relativa la longitud internasal, la longitud y ancho orbital (este hecho ha sido reportado en la mayoría de las especies).

Tabla 3. Análisis alométrico de las medidas craneales.

Medidas	α	b	r	T	P	Tipo de alometría
Ancho	0,9065	1,2784	0,9166	-0,3531	$P > 0.05$	Isometría
Long. del morro	0,9249	0,2315	0,7213	-0,7816	$P > 0.05$	Isometría
Long.Posorbital	0,9163	0,5539	0,9331	-0,6849	$P > 0.05$	Isometría
Long. Internasal	0,7658	0,2627	0,733	-2,4186	$P < 0.05$	Alometría negativa
Long. Interorbital	0,9418	0,4681	0,8799	-0,5623	$P > 0.05$	Isometría
Long. Orbital	0,6862	0,4033	0,7766	-5,705	$P < 0.05$	Alometría negativa
Ancho orbital	0,6699	0,3089	0,7675	-3,8606	$P < 0.05$	Alometría negativa

Donde: a = coeficiente de alométría; b = valor de la medida cuando la longitud total posee el valor de 1; r = coeficiente de correlación; t = valor de la prueba de "t" cuando se compara a con el valor de isometría, que en este caso fue 1; p = Probabilidad observada.

Tabla 4. Análisis alométrico de las medidas craneales.

Medidas	A	b	r	t	P	Tipo de alometría
Longitud total	0,92689	0,9269	0,9166	-0,1131	$P > 0.05$	Isometría
Long. del morro	1,0701	0,1685	0,8252	0,1087	$P > 0.05$	Isometría
Long.Posorbital	0,9324	0,4804	0,9389	-0,1027	$P > 0.05$	Isometría
Long. Internasal	0,9205	0,1927	0,8713	-0,0215	$P > 0.05$	Isometría
Long. Interorbital	0,9903	0,3872	0,915	-0,0147	$P > 0.05$	Isometría
Long. Orbital	0,7514	0,3374	0,8409	-0,4384	$P > 0.05$	Isometría
Ancho orbital	0,7379	0,258	0,8361	-0,4668	$P > 0.05$	Isometría

Donde: a = coeficiente de alométría; b = valor de la medida cuando la longitud total posee el valor de 1; r = coeficiente de correlación; t = valor de la prueba de "t" cuando se compara a con el valor de isometría, que en este caso fue 1; p = Probabilidad observada.

Con respecto a las longitudes craneales, cuando se toma como referencia el ancho total (Tabla 4) se observa todas las medidas poseen un comportamiento isométrico, es decir que con respecto a la anchura las longitudes relativas crecen al mismo ritmo.

ANÁLISIS ALOMÉTRICO DE LAS MEDIDAS DE ANCHO Y LARGO DE LAS VERTEBRAS

Se tomó como medida base el ancho vertebral, esto es debido a que está determinado por el ancho de la notocorda, de ahí que es la que definiría el largo vertebral.

Del análisis de las primeras 20 vertebras, cuyo criterio de regionalización se muestra en el apéndice II), se Las tablas 5 y 6 que se muestra a continuación:

Tabla 5. Análisis alométrico del ancho y largo de las vértebras torácico-sacras.

Vertebra	α	b	r	t	P	Tipo de alometria
1	1,0348	0,6995	0,901	0,4481	P>0.05	Isometría
2	1,0498	0,7859	0,8828	0,7184	P>0.05	Isometría
3	0,96898	0,7502	0,8748	-0,4848	P>0.05	Isometría
4	0,9494	0,7137	0,8706	-0,6727	P>0.05	Isometría
5	1,0234	0,7367	0,8748	0,287	P>0.05	Isometría
6	1,0465	0,7458	0,8798	0,5736	P>0.05	Isometría
7	1,0801	0,7602	0,8543	0,614	P>0.05	Isometría
8	1,0372	0,7192	0,8081	0,3981	P>0.05	Isometría
9	1,1943	0,7756	0,817	1,742	P>0.05	Isometría
10	1,1921	0,7412	0,8127	1,5805	P>0.05	Isometría
11	1,1587	0,7366	0,7448	1,3032	P>0.05	Isometría
12	1,1934	0,7468	0,7721	1,5675	P>0.05	Isometría
13	1,145	0,7251	0,6809	1,1438	P>0.05	Isometría
14	1,1249	0,7033	0,7038	1,005	P>0.05	Isometría
15	1,2979	0,7648	0,7937	2,1443	P<0.05	Alometria positiva
16	1,3167	0,791	0,7664	2,3583	P<0.05	Alometria positiva
17	1,2286	0,7752	0,7535	1,9292	P>0.05	Isometría

Donde: a = coeficiente de alométría; b = valor de la medida cuando la longitud total posee el valor de 1; r = coeficiente de correlación; t = valor de la prueba de "t" cuando se compara a con el valor de isometría, que en este caso fue 1; p = Probabilidad observada.

Tabla 5 continuación. Análisis alométrico del ancho y largo de las vértebras.

Vertebra	α	b	r	t	P	Tipo de alometria
18	1,241	0,8055	0,7225	2,0653	P<0.05	Alometria positiva
19	1,4128	0,9484	0,7448	3,2674	P<0.05	Alometria positiva
20	1,5475	1,0972	0,7861	4,2383	P<0.05	Alometria positiva
21	1,3752	1,0196	0,8923	13,511	P<0.05	Alometria positiva
22	1,3601	1,0276	0,8936	12,7906	P<0.05	Alometria positiva
23	1,3657	1,0242	0,8795	11,9124	P<0.05	Alometria positiva
24	1,3737	1,0322	0,8765	11,2589	P<0.05	Alometria positiva
25	1,359	1,029	0,8844	11,7254	P<0.05	Alometria positiva
26	1,4006	1,0577	0,8731	10,751	P<0.05	Alometria positiva

Donde: a = coeficiente de alométría; b = valor de la medida cuando la longitud total posee el valor de 1; r = coeficiente de correlación; t = valor de la prueba de "t" cuando se compara a con el valor de isométría, que en este caso fue 1; p = Probabilidad observada.

Es notorio que a partir de la vértebra 14 se empieza a observar una alométría positiva, la vertebra 17 corresponde a la vértebra sacra y de la 18 a la 26 son vertebras caudales.

DISCUSIÓN

En el análisis morfométrico, se pudieron observar las diferencias puntuales sobre los valores arrojados en las mediciones, pues al considerarse en primera instancia, la longitud de los organismos como referencia para el análisis se obtuvieron valores de coeficiente de variación muy elevados, por lo que se optó por considerar el ancho de los organismos, esto último dejó en claro que para realizar el análisis morfométrico craneal del *A. mexicanum* la mejor medida para realizarlo es el ancho y de esta manera se obtiene un valor de coeficiente de variación más adecuado.

En cuanto a los valores craneales, se observó que para el ancho del cráneo existe una isometría, al igual que para la longitud del morro, longitud pos orbital e interorbital, mientras que para la longitud internasal, longitud orbital y ancho orbital se arrojaron agometrías negativas, estos últimos los podemos relacionar con las alometrías obtenidas por Sheen y Whiteman (1998), quienes hacen una relación entre el tamaño de la cabeza y el cuerpo en la salamandra tigre, a través de una regresión lineal y plantean tres hipótesis; la hipótesis de obtener alometrías positivas, obteniendo cabezas más grandes en organismos caníbales, que si se llegase a mostrar una diferencia en el tamaño de las cabezas, se refiere solo a que los organismos en longitud son más grandes; la segunda hace referencia a que se presente una tasa de crecimiento craneal más rápida y la tercera es que los organismos presenten una tasa de crecimiento más rápido al inicio de la ontogenia y luego este crecimiento se reduce durante las etapas posteriores.

Obtuvieron una alometría negativa para el cráneo y observaron que tienen un rápido crecimiento temprano del mismo. Así como Nymal y colaboradores (1993), afirman que el crecimiento es consistente con la aceleración temprana del crecimiento de la cabeza en caníbales.

Las alometrías negativas obtenidas en el ojo se consideran un crecimiento normal, pues no se ha encontrado que otros autores demuestren lo contrario, que la órbita no tenga una alometría negativa. Así como en el análisis del cráneo es algo que se ha reportado en muchas especies.

Del mismo modo, las isometrías encontradas en *A. mexicanum* del presente trabajo son medidas similares a las reportados por Anderson y colaboradores en 2016, quienes obtienen isometrías del ancho del ancho de la cabeza y longitud hocico respiradero en el periodo larvario temprano, de las salamandras veteadas *A. maculatum*.

Podemos concluir, que para en análisis de longitud craneal todos son isométricos sin incluir los ojos, con respecto al ancho del mismo. El ancho se atribuye a que es definido por la notocorda. En términos generales es la que soporta a todo el cuerpo del organismo y se puede atribuir a que es la que marca la diferencia del desarrollo de los organismos.

Atkins et al., desarrollan una descripción del cráneo tomando como referencia la tabla de Nye et al., quienes realizan una tabla descriptiva del desarrollo del *A. mexicanum*, para complementar las etapas y asignar estadios por medio de la anatomía craneal y no exclusivamente por las extremidades.

En las imágenes registradas del presente trabajo del desarrollo del *A. mexicanum* se pudieron identificar las etapas **44** y **45**, en donde no hay osificaciones evidentes aún en estas etapas; **46** en donde se observa vómer, palatino, coranoides y dentarios; **47** en donde hay de 5 a 7 dientes en el coranoides; **48** aparece la premaxila como una delgada tira de hueso y aún no tiene dientes y se comienza a ver el parasfenoide que se va extendiendo entre las cápsulas oóticas.; **49** la premaxila toma forma de T por la apófisis alargadas y delgadas, el escamoso se ve finalmente en la parte posterodorsal, vómer y palatino un tanto similares a la etapa 48; **50, 51,52,53,54,55,56,57.**

Si bien, se puede observar que Atkins et al., (2019) presentan 14 etapas diferenciadas por el desarrollo de las diferentes osificaciones de los huesos, lo hacen como referencia a lo realizado por Nye et al., (2003) mientras que en el presente análisis se registraron por medio de la técnica de *diafanización y tinción doble* más etapas de las registradas con los autores, por ejemplo, en donde se observan etapas donde los cúmulos óseos comienzan a formarse antes de cualquier osificación.

ORDENADA EN EL ORIGEN VALOR DE R Y TIPO DE ALOMETRIA

Se realizaron las mediciones de todas las vértebras que se presentaron en todos los organismos del análisis, ya que el criterio para los dicho método fue que estuviera presente en todos los organismos adultos. Es decir que se contabilizaron veintiséis vertebras.

Para estos resultados obtuvimos que desde la vértebra uno hasta la presencia de la vértebra sacra (vértebra 17) el crecimiento es isométrico, excluyendo 16 y 5 que presentan un desarrollo alométrico positivo, después de la vértebra sacra, se observan las vértebras restantes (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26) alometrías positivas. Esto indica que la longitud de la cola crece a una velocidad más elevada que la columna vertebral, en otras palabras, la cola del *A. mexicanum* crece más rápido.

Los resultados para la cola de *A. mexicanum* indican que presenta una alometría positiva, pues como ya se mencionó, después de la vértebra 17 se incrementan los coeficientes (a), incrementando de manera rápida y en buena medida el

crecimiento, lo que hace referencia en sí a un crecimiento más rápido de la cola que del tronco, esto se puede comparar con lo que muestra Howard (2009) pues revela que la longitud de la cola es un rasgo alométrico positivo en *A. tigrinum*. El autor realizó un análisis alométrico estático en la cola de estos organismos para encontrar dimorfismos sexuales dentro de la especie, a pesar de esto, afirma que la alometría positiva se presenta en ambos sexos.

Además, se observa que a antes de la vértebra 15 el crecimiento de estas es isométrico en todas. A vista, se observa que los organismos que presentan hasta la vértebra 15 son organismos pequeños, con extremidades en desarrollo, lo que hace referencia a lo menciona Howard (2019) durante el análisis ontogenético que realiza, en donde revela que la longitud de la cola es isométrica en larvas y metamorfos jóvenes machos y hembras.

CONCLUSIÓN

En base al análisis de los resultados obtenidos, es concluir que:

1.- Las evidencias no señalan que para el análisis morfométrico es más adecuada usar la anchura craneal que la longitud total del cráneo, ya que nos permite determinar con mayor precisión que medidas están sometidas a presión de selección.

2.-El crecimiento alométrico de la cabeza es isométrico, hecho que concuerda con el poco cambio de la morfología general de la cabeza desde las larvas mas tempranas hasta el adulto.

3.- El crecimiento alométrico negativo encontrado en las medidas oculares es un fenómeno común en todos los grupos de vertebrados.

4.- El análisis alométrico nos permite regionalizar en cuatro regiones la columna vertebral del *Ambystoma mexicanum*, estas son:

Dos regiones del tronco: una región de crecimiento isométrico de las vértebras de la 1 a la 14; una segunda región de crecimiento alométrico positivo de las vértebras 15 y 16.

Región sacra con una vértebra sacra con crecimiento isométrico.

Región caudal, con nueve vertebras estudiadas con crecimiento alométrico, positivo.

5.- Por último, cabe señalar que la regionalización que se encontró con el análisis alométrico de la región del tronco, es el primer reporte que se realiza de este fenómeno, el cual deberá abordarse en futuros estudios.

REFERENCIAS

- Anderson T., Housterhout B., Drake D., Burkhart J., Rowland F., Peterman W. y Semlitsch R., (2016). Differences in Larval Allometry Among Three Ambystomatid Salamanders. *Journal of Herpetology* Vol. 50 No. 3, 464-470.
- Álvarez, J. (1980), *Los cordados. Origen, evolución y hábitos de los vertebrados*, México D.F, Compañía Editorial Continental S.A.
- Atkins J., Houle L., Cantelon A. y Maddin H., (2020). Normal development in *Ambystoma mexicanum*: A complementary staging table for the skull based on Alizarin red S staining. *Developmental Dynamics* ;249:656–665.
- Arntzen J. (1994) Allometry and autotomy of the tail in the Golden-striped salamander, *Chioglossa lusitánica*, *Amphibia-Reptilia* 15: 267-274.
- Canseco-Márquez, L. y G. Gutiérrez-Mayén. (2010). Anfibios y reptiles del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Conabio, Fundación para la Reserva de la Biosfera Cuicatlán, A. C, y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 302 p
- CONABIO (2011). Fichas de especies prioritarias. Ajolote Mexicano (*Ambystoma mexicanum*) Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.
- Gersenowies, J. R. y Sánchez, F. (2010). Descripción Anatómica del Esqueleto de los Tractos Respiratorios Superiores del Periquito Australiano (*Melopsittacus undulatus*). *International Journal of Morphology*, 28(1), 85-92.
- Howard R., (2009) Ontogeny of a sexual dimorphism in tiger salamanders. *Cadonian Journal of Zoology*, (18):7.
- Humphrey, R., (1972). Genetic and experimental studies on a mutant gene (C) determining absence of heart action in embryos of the Mexican axolotl (*AMBYSTOMA MEXICANUM*). ELSEVIER, *Developmental biology*, 27(3), 365-375.

- Jiang J., Jia J., Zhang M. & Gao K. (2018). Osteology of *Batrachuperus londongensis* (Urodela, *Hynobiidae*): study of bony anatomy of a facultatively neotenic salamander from Mount Emei, Schua Province, China. Peer 6: e4517
- Lee, J. & Gardiner, D.M. (2012) Regeneration of Limb Joints in the Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). PLoS ONE 7(11), 1-8
- Molina A., (2010). El axolote de Xochimilco. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 54-59.
- Nye H., Cameon J., Chernoff E. y Stocum D., (2002). Extending the Table of Stages of Normal Development of the Axolotl: Limb Development. Developmental Dynamics 226:555–560.
- Quinzio, S., Goldberg J., Cruz J., Pereyra M. y Fabriza M. (2015). La morfología de los Anuros: pasado, presente y futuro de nuestras investigaciones. Instituto de Bio y Geociencias (IBIGEO). Centro Científico Tecnológico CONICET, 29(1), 51-67.
- Reilly, S. y Lauder G., (1990) Metamorphosis of Cranial Design in Tiger Salamanders (*Ambystoma tigrinum*): A Morphometric Analysis of Ontogenetic Change. Journal of Morfphology, 204:121-137.
- Sheen J. y Howard H., (1998) Head and Body Size Relationship in Polymorphic Tiger Salamander Larvae from Colorado, Copeia (4) 1089-1093 pp.
- Sandoval D., Téllez J., García A., Rivera G., Moreno S. y Moreno F. (2016). Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo: revisión de la literatura. Univ Med. 57(4):488-501.
- Tamayo L.J., Suárez P.A., Cano A.I., Cuartas B.A., Yepes S.A., Mejía C.A. & Lenis Y.Y. (2012). Didactic model of the chicken embryo development using

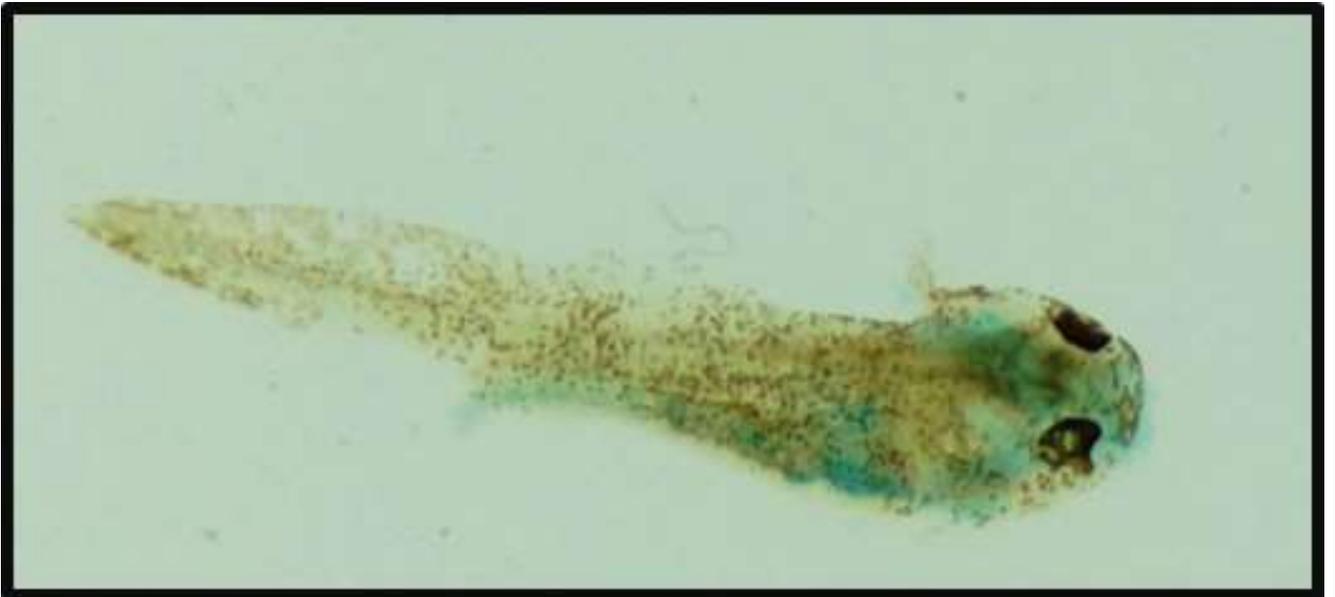
modified Dawson's diaphanization and staining technique. Rev Colomb Cienc Pecu. ;25(4):620-4.

- Vargas-Gonzalez A., Prado-Zayago E., León-Olea M., Guarner-Lans V. y Cano-Martínez A. (2005). Regeneración miocárdica en *Ambystoma mexicanum* después de lesión quirúrgica. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, 75(3), 21-29

- Zaballos J. y M., Moreno A., (2009). Modelos adaptativos en Zoología (Manual de prácticas) 1. Pruebas anatómicas y taxonómicas de la evolución: homologías, analogías, simetrías. Reduca (Biología). Serie Zoología. 2(2): 1-19.

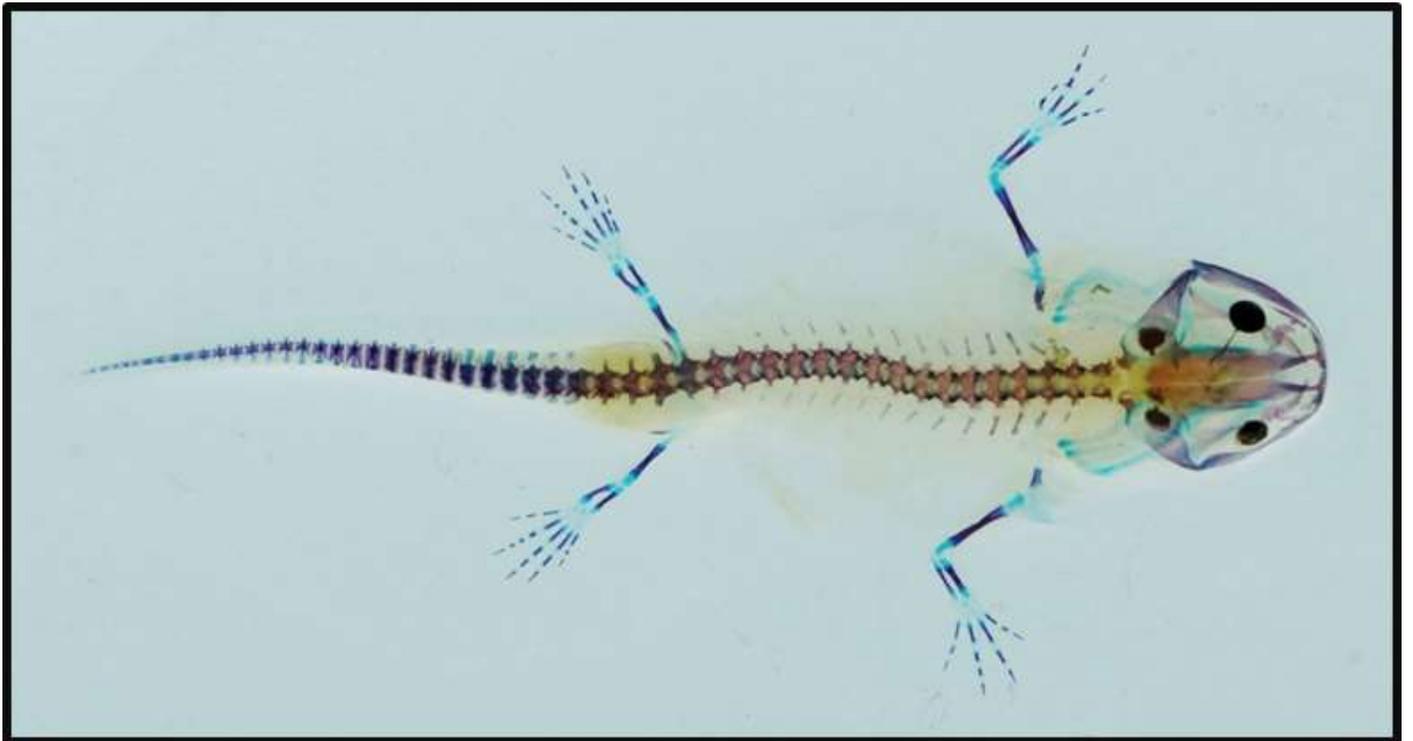
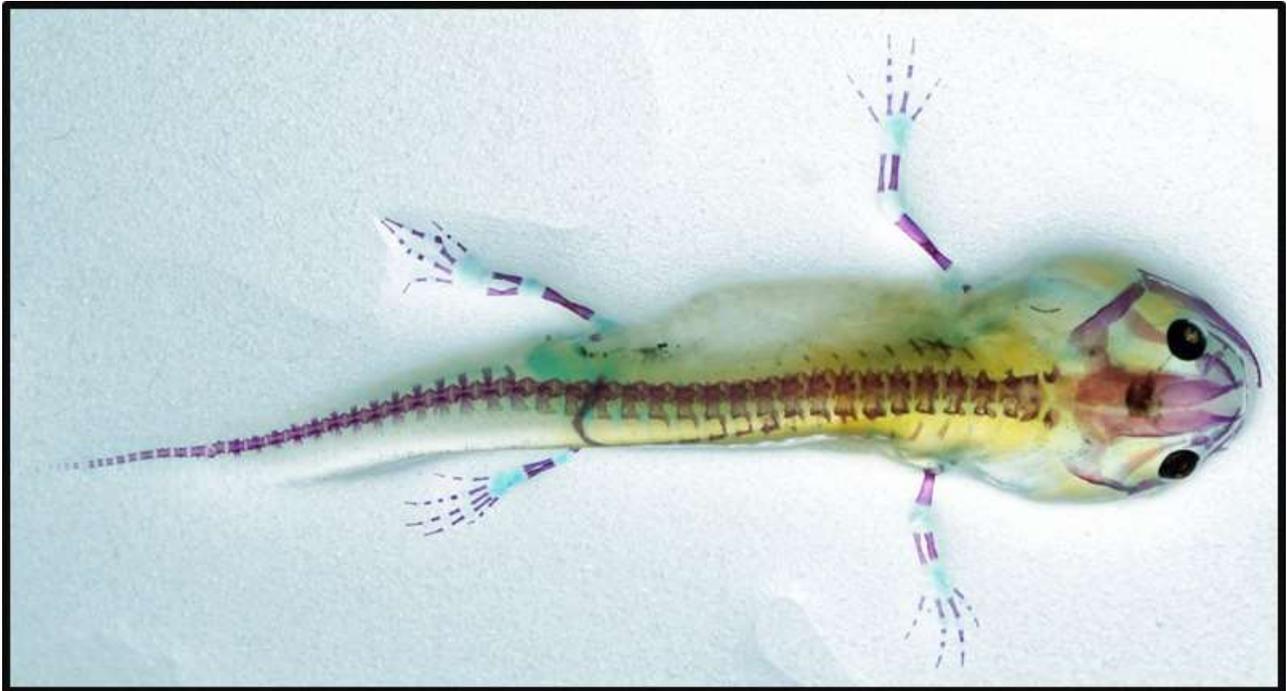
APÉNDICE I

Muestras de los especímenes transparentados en diferentes estadios Utilizados en el presente estudio











APÉNDICE II

Porciones de la columna vertebral del *Ambystoma mexicanum*

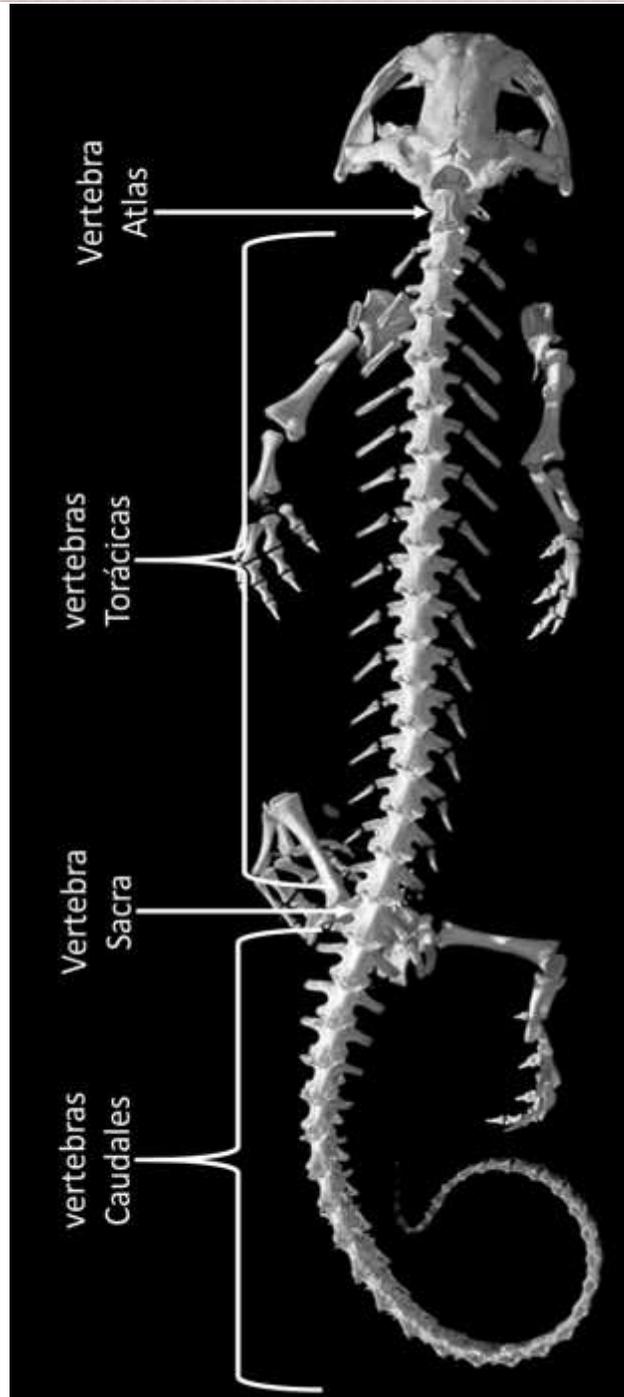


Imagen modificada de http://digimorph.org/specimens/Ambystoma_tigrinum/whole/