

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN ESPERMÁTICA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS
OVOCITOS DE DIFERENTES POBLACIONES DE CUEVA Y SUPERFICIE DE LA
SARDINITA CIEGA MEXICANA *Astyanax mexicanus* (DE FILIPPI, 1853)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

RODRIGUEZ BALLESTEROS VICTOR HUGO

Asesores:

Dra. Claudia Patricia Ornelas García

Dr. Raúl Ulloa Arvizu

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Agosto de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres María de Jesús Ballesteros Santiago y Jorge Rodríguez Cerón por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Erick Alberto Rodríguez Ballesteros y Jesús Antonio Rodríguez Ballesteros por siempre estar a mi lado en los buenos y malos días que tuve durante mi vida académica.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis la Dra. Claudia Patricia Ornelas García del Instituto de Biología por el apoyo brindado y los consejos que me llevaron a culminar con mi trabajo y sobre todo por la confianza y oportunidad que me brindó para llevar a cabo este proyecto.

A mi co-asesor de tesis el Dr. Raúl Ulloa Arvizu del departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por el apoyo incondicional en la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Alberto Balcazar y la Dra. Ana Delia Rodríguez Cortez del departamento de Reproducción de la FMVZ por la asesoría brindada para llevar a cabo las técnicas de recolección y realización de frotis de eyaculado y por el préstamo de material de laboratorio y de sus instalaciones para llevar a cabo la preparación de soluciones que se utilizaron para la limpieza y mantenimiento de ovocitos fertilizados.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias Técnico Académico del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad del IBUNAM por la asesoría y apoyo en la toma de las fotografías de microscopía electrónica presentadas en el presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio José Alberto Hernández y Adriana Medina Islas por el apoyo en el cuidado y mantenimiento de las unidades experimentales.

Al proyecto PAPIIT-IN 212419 por el apoyo económico brindado para poder llevar a cabo este proyecto.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a todos los profesores que me brindaron una enseñanza sólida, en especial a los revisores de esta tesis, quienes atendieron mis dudas y me apoyaron con sus correcciones, sugerencias y comentarios.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Antecedentes.....	3
1.1.1 <i>Astyanax mexicanus</i> como un organismo modelo.....	3
1.1.2 Comportamiento reproductivo.....	6
1.2 Factores que influyen en la reproducción.....	7
1.2.1 Efecto de la temperatura como estímulo en el desove de <i>Astyanax mexicanus</i>	7
1.3 Estímulos hormonales.....	8
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo general.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. HIPÓTESIS	13
4. MATERIAL Y MÉTODOS	14
4.1 Poblaciones analizadas.....	14
4.2. Diseño experimental.....	16
4.2.1. Fotoperiodo.....	16
4.2.2. Tratamientos térmicos.....	17
4.3. Aplicación de Ovaprim.....	19
4.4. Obtención y evaluación de gametos en microscopía electrónica y óptica.....	20

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
6. RESULTADOS	26
6.1 Análisis de Componentes Principales de Las variables de calidad del agua.....	26
6.2 Efecto de temperatura y fotoperiodo.....	28
6.3 Evaluación espermática.....	30
6.3.1 Viabilidad espermática.....	30
6.3.2 Área de la cabeza de los espermatozoides.....	30
6.4 Descripción morfológica de los ovocitos.....	32
7. DISCUSIÓN	37
7.1. Efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre la actividad reproductiva de los machos de diferentes poblaciones de cueva y superficie de <i>Astyanax mexicanus</i> , a través de una evaluación espermática.....	37
7.2. Efecto de la preparación hormonal de sGnRHa de salmón + Domperidona (Ovaprim) sobre la actividad reproductiva de las hembras de diferentes poblaciones de cueva y superficie de <i>Astyanax mexicanus</i>	41
7.3. Descripción morfológica de los ovocitos de diferentes poblaciones de cueva y superficie de <i>Astyanax mexicanus</i>	42
8. CONCLUSIONES	46
9. ANEXOS	48
10. REFERENCIAS	60

RELACIÓN DE TABLAS

página

Tabla 1. Número de unidades experimentales (UE) y número total de organismos que se utilizaron por tratamiento de fotoperiodo.....	14
Tabla 2. Horario de alimentación y tipo de alimento que se proporcionó a los peces durante el experimento.....	16
Tabla 3. Asignación de tratamientos térmicos por semana en las diferentes poblaciones.....	19
Tabla 4. Medias \pm desviaciones estándar de cada variable, separadas por semana y fotoperiodo.....	28
Tabla 5. Medias marginales estimadas del porcentaje de machos activos reproductivamente de acuerdo a la Temperatura.....	30
Tabla 6. Evaluación espermática de las 4 poblaciones troglobias y la población de superficie de <i>Astyanax mexicanus</i>	31
Tabla 7. Medias evaluadas de las diversas estructuras que conforman al ovocito de <i>Astyanax mexicanus</i>	33

RELACIÓN DE FIGURAS

página

Figura 1 Localización de la sardinita mexicana (<i>Astyanax mexicanus</i>) en la Sierra del Abra, Guatemala y la Colmena.....	4
Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.....	11
Figura 3. Morfotipo de superficie y morfotipo troglobio de la especie <i>Astyanax mexicanus</i>	15
Figura 4. Condiciones de fotoperiodo.....	17
Figura 5. Representación de los cambios de temperatura que se realizaron en cada tratamiento térmico.....	18
Figura 6. Administración de la hormona, un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina de salmón (sGnRHa) y un inhibidor de la dopamina (Ovaprim).....	20
Figura 7. Procedimiento de obtención de gametos.....	22
Figura 8. Procedimiento para realizar el frotis del eyaculado.....	23
Figura 9. Representación del conteo de los poros del corion del ovocito.....	24
Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA).....	27
Figura 11. Porcentaje de machos reproductivos por población.....	29
Figura 12. Tinción de vitalidad de eosina-nigrosina.....	32
Figura 13. Comparación del ovocito, micrópilo y corion de las diferentes poblaciones troglobias y de superficie de <i>Astyanax mexicanus</i>	34
Figura 14. Corion del ovocito antes y después de ser fertilizado.....	35
Figura 15. Tapón en la zona del micrópilo una vez realizada la fertilización del ovocito.....	35
Figura 16. Presencia de vellosidades en los ovocitos.....	36

RELACIÓN DE ANEXOS

Página

Anexo 1. Eigenvalor y porcentaje de varianza de cada uno de los componentes principales (CP) y varianza acumulada.....	48
Anexo 2 Porcentaje de varianza de cada componente principal (CP) una vez eliminado el tercer componente, donde se observa que los dos primeros componentes representan el 66.5% de la varianza.....	49
Anexo 3. Medias de los nitritos por semana y fotoperiodo.....	50
Anexo 4. Medias de los nitratos por semana y fotoperiodo.....	51
Anexo 5. Medias de la conductividad por semana y fotoperiodo.....	52
Anexo 6. Medias de la salinidad por semana y fotoperiodo.....	53
Anexo 7. Medias del porcentaje de oxígeno disuelto por semana y fotoperiodo.....	54
Anexo 8. Medias del fosfato por semana y fotoperiodo.....	55
Anexo 9. Medias del amonio por semana y fotoperiodo.....	56
Anexo 10. Medias del pH por semana y fotoperiodo.....	57
Anexo 11. Porcentaje de machos que se encontraron reproductivos en cada semana de tratamiento térmico.....	58
Anexo 12. Medias marginales estimadas del porcentaje de machos activos reproductivamente de acuerdo al Fotoperiodo.....	59

RESUMEN

RODRÍGUEZ BALLESTEROS VÍCTOR HUGO. Evaluación espermática y descripción morfológica de los ovocitos de diferentes poblaciones de cueva y superficie de la sardinita ciega mexicana *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853). Bajo la dirección de la Dra. Claudia Patricia Ornelas García y el Dr. Raúl Ulloa Arvizu.

Astyanax mexicanus es un pez endémico de México que presenta dos formas: una de superficie y otra adaptada a las cuevas (troglobia), lo cual lo hace un excelente modelo para el estudio de la evolución regresiva. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto que tienen la temperatura, el fotoperiodo y una combinación hormonal de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina de salmón (sGnRHa) y un inhibidor de la dopamina (Domperidona) sobre las características reproductivas (morfología de ovocitos y evaluación espermática) de poblaciones de cueva y superficie de *Astyanax mexicanus*. Se usaron 15 unidades experimentales (UE de 2 machos y 1 hembra) mantenidas en dos fotoperiodos, y bajo diferentes estímulos térmicos. El fotoperiodo de total oscuridad tuvo un efecto menor en la reproducción de *Astyanax mexicanus*. Además se obtuvo un mayor número de ovocitos en las poblaciones que se les administró la combinación hormonal (sGnRHa+Domperidona), en comparación con las poblaciones que no recibieron la hormona. En imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) fue posible caracterizar a los ovocitos, los cuales presentan forma esférica con una superficie estriada, conformados por ooplasma, corion con poros, que se cierran al momento de la fertilización, y una membrana externa, la cual forma un tapón en la zona del micrópilo después de la fertilización. La población de Rascón (superficie) presentó la mayor viabilidad espermática (99%), y la cabeza del espermatozoide con la menor área (Me=4 μm); mientras que Pachón (cueva) mostró el menor porcentaje de viabilidad (Me=8%) y la mayor área de la cabeza del espermatozoide (Me=9.19 μm). Estos resultados permiten establecer líneas reproductivas de *Astyanax mexicanus* en cautiverio.

1. Introducción

El género *Astyanax* dentro de la familia Characidae es uno de los géneros con más especies, y el cual presenta una alta plasticidad morfológica, así como una resiliencia para adaptarse a diferentes ambientes (Ornelas-García *et al.* 2008). Dentro de este género encontramos a la especie endémica de México, *Astyanax mexicanus* la cual presenta dos formas fuertemente contrastantes, la de superficie y una forma de cueva, las cuales han probado ser interfértiles tanto en condiciones de laboratorio como silvestres, lo que lo hacen un modelo único para estudios evolutivos que permiten caracterizar las bases genéticas de los cambios morfológicos que se han presentado como una adaptación a las poblaciones de cuevas.

Estudios filogenéticos recientes tanto de las poblaciones de cuevas, como de superficie, han propuesto que las 31 poblaciones de cuevas en las regiones de la Sierra del Abra, Guatemala y la Colmena, podrían haber derivado de al menos dos linajes de superficie (Herman *et al.* 2018). Por lo tanto, varias poblaciones de cueva tienen un origen independiente, lo que hace a este un sistema idóneo para estudiar evolución en paralelo. Es importante señalar que estas poblaciones dan una oportunidad única de comparar las adaptaciones, algunas regresivas y otras constructivas, a un ambiente de condiciones extremas (como lo son las cuevas), que se han originado a partir de un ancestro cuyo linaje aún existe, lo que hace posible explorar a profundidad todos los aspectos biológicos relacionados con su evolución y adaptación.

En este sentido la comunidad científica que estudia a este organismo modelo se encuentra en pleno crecimiento, tanto a nivel nacional como internacional, en diferentes líneas de investigación, aunque la mayor parte de la investigación está relacionada con aspectos de biología del desarrollo (K. Zilles *et al.* 1983; H. Wilkens 1988; R. Yokoyama 1990; T. Teyke 1990; S.I. Tomarev 1997; A.G. Strickler *et al.* 2001), genómica comparada (Herman *et al.* 2018; Sylvie Rétaux *et al.* 2013; Joshua B. Gross *et al.* 2013), fisiología (Masato *et al.* 2012) y conducta (Borowsky 2013; Duboue *et al.* 2011; Espinasa *et al.* 2005; Rétaux and Elipot 2013), entre otros.

Debido a lo anterior, varias líneas reproductivas de *Astyanax mexicanus* tanto de superficie como de cueva han sido mantenidas en cautiverio en varios

laboratorios alrededor del mundo, sin embargo en México no se tenían laboratorios donde exitosamente se hubiera logrado reproducir ejemplares de esta especie, tanto de cuevas como de superficie. Fuera de México, algunas poblaciones no han podido ser cultivadas (p. ej. Molino). Por lo anterior, a pesar del desarrollo de herramientas genéticas y moleculares que están disponibles para el estudio de este organismo modelo, similar a la manipulación genética en otros organismos modelo como el pez cebra (*Danio rerio*), la sardinita ciega mexicana *Astyanax mexicanus jordani* tiene un gran potencial tanto en la caracterización, estudio y desarrollo de herramientas genómicas para entender las variantes genéticas que han permitido que de manera independiente dos linajes hayan convergido en formas de cueva (troglodias). En el presente estudio se llevará a cabo la primera descripción morfológica de los ovocitos y la evaluación espermática de cuatro poblaciones de cuevas (Cueva del Pachón, Sótano de Pichijumo, Sótano de Vázquez y Sótano de Tigre) y una población de superficie (Rascón) de *Astyanax mexicanus*, utilizando estímulos térmicos y hormonales para estimular la espermatogénesis y ovogénesis, y obtener los gametos.

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Astyanax mexicanus* como un organismo modelo

La sardinita mexicana (*Astyanax mexicanus*) es un pez que presenta un morfotipo de superficie que habita en los arroyos de América del Norte y se conocen al menos 31 poblaciones de cueva que presentan un morfotipo troglodio o de cueva (Elliot 2016), la forma troglodia es endémica de cuevas de piedra caliza en la región de la Sierra de El Abra, en el Noroeste de México (Protas 2012), la Sierra de Guatemala, al norte de la Sierra de El Abra, y el área de Micos, adyacente a la Sierra de la Colmena y al Oeste de la Sierra de El Abra (Mitchell 1977) (figura 1). Los morfotipos de esta especie se han utilizado como modelo de estudio de biología evolutiva debido a que presentan una oportunidad única para la caracterización de las bases genéticas de características fenotípicas regresivas (Protas *et al.* 2006), por ejemplo la pérdida de la visión y la pigmentación.

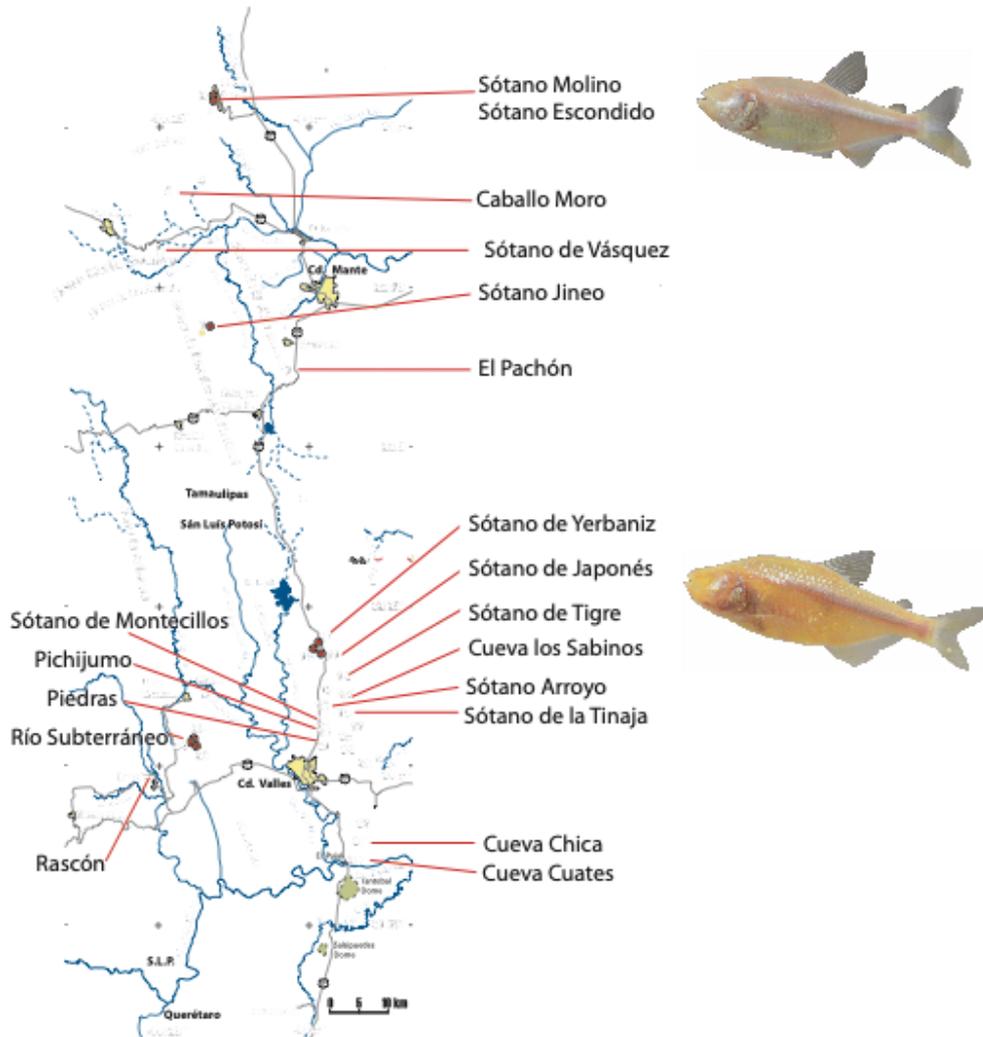


Figura 1 Localización de la sardinita mexicana (*Astyanax mexicanus*) en la Sierra del Abra, Guatemala y la Colmena.

A pesar de la pérdida de la visión en las poblaciones de cueva, se ha demostrado que la glándula pineal es funcional y muy sensible a la luz, además no presenta diferencias morfológicas en comparación con los peces de superficie (Grunewald-Lowenstein, 1956). Yoshizawa *et al.* (2008) mencionan que la glándula pineal se conserva en el pez de cueva debido a su capacidad de detección térmica, ya que en ambos morfotipos el desove se produce con los cambios de temperatura, produciendo melatonina la cual regula el ritmo circadiano y el comportamiento reproductivo en otras especies de peces (Zachmann *et al.* 1992; Falcón *et al.* 2009).

Bajo total oscuridad en el ambiente de la cueva, el ritmo circadiano puede no ser importante, de hecho, los peces de cueva muestran una reducción del sueño y un ritmo circadiano atenuado (Beale *et al.* 2013), en comparación con los peces de superficie, donde el sueño de las larvas es diurno y similar en duración al del pez Cebra (Duboué *et al.* 2011). Se ha propuesto que la reducción de la duración del sueño proporciona más tiempo para la alimentación, compensando así la poca disponibilidad de alimento en el ambiente de cueva (Duboué *et al.* 2011). Otra adaptación que presentan las poblaciones de cueva para compensar la reducción de alimento es el comportamiento de atracción por vibración (VAB), éste describe el comportamiento de los peces al nadar hacia un objeto que vibra en la oscuridad (Wilson *et al.* 2004). Siendo VAB importante para el forrajeo en un ambiente con poca disponibilidad de alimento, luz y depredadores (Yoshizawa *et al.* 2010). Además del VAB, la sensibilidad del sentido olfativo y gustativo se ha incrementado en los peces de cueva. Schemmel (1967) señaló que los orificios nasales están más abiertos y aplanados en el pez de cueva, por lo que las láminas están más expuestas, aumentando su capacidad de percibir el estímulo químico de una fuente de alimento (Menuet *et al.* 2007). Bibliowicz *et al.* (2013) encontraron que los peces troglomórficos presentan un tamaño de nariz significativamente mayor y esto se asoció con una fuerte respuesta conductual provocada por extractos de alimentos.

En cuanto al sentido gustativo, Schemmel (1974) encontró mayor número de papilas gustativas en el pez de cueva y describió tres tipos diferentes de papilas gustativas que se distribuyen en la cavidad oral de ambos morfos, pero solo los peces de cueva albergan algunas papilas en su mandíbula inferior. Además los plexos de fibra nerviosa de las papilas gustativas tipo II y III contienen más axones en los peces de cueva (Boudriot y Reutter 2001) y hay más células receptoras sensoriales por paladar en los peces de cueva (Varatharasan *et al.* 2009). En conjunto a las modificaciones conductuales en los ambientes de cueva se les conoce como el “síndrome de comportamiento” (Sih *et al.* 2004).

1.1.2 Comportamiento reproductivo

Sadoglu (1979) presentó un método de reproducción basado en ritmos anuales para obtener desoves regulares y frecuentes, en el que encontró que *Astyanax mexicanus* a diferencia de otros peces tropicales criados en el laboratorio, sigue un ciclo de reproducción anual que persiste a pesar de la ausencia de las señales estacionales como la variación en el fotoperiodo y la temperatura, donde la temporada de mayor desove fue entre los meses de Marzo y Mayo con un 53.4% de desoves y entre los meses de Septiembre y Noviembre con un 28% de los desoves. Además dentro de su conjunto de apareamientos encontró que la temperatura del agua fluctuó entre 19 y 30°C, sin embargo la temperatura óptima del agua fue entre 25 y 28°C, con un 72.9% de desoves.

Breder (1942) descubrió que en cautiverio, la adición de un poco de agua fría al acuario provocó el desove, lo que lo llevaría a postular que la temporada de lluvias es el período reproductivo de *Astyanax mexicanus*, posiblemente la afluencia de agua dulce en la temporada de lluvias desencadena la actividad reproductiva, no por la temperatura, sino por el relativo enriquecimiento de oxígeno.

Con respecto al cortejo, Wilkens (1971) indicó que los machos se activan por las hembras comenzando a nadar rápidamente; cuando los machos se encuentran con una hembra madura, los dos comienzan a nadar sincrónicamente y liberan esperma y huevos (Wilkens 1971). También se afirmó que la activación del macho depende del sistema olfatorio porque la alteración del nervio olfatorio suprime el comportamiento de persecución de la hembra.

Actualmente se sabe que el comportamiento reproductivo y de desove de *Astyanax mexicanus* considera cinco fases que corresponden con: natación inferior de la hembra, persecución del macho, natación sincronizada ascendente del macho y la hembra, envoltura del macho con la hembra y desove; la interacción entre machos y hembras se facilita por la presencia de pequeños dentículos en la aleta anal del macho (dimorfismo sexual) que probablemente ayudan al macho a enganchar a la hembra; esta descripción fue llevada a cabo por Simon *et al.* (2019) con una proporción sexual de 2 machos para 1 hembra.

1.2 Factores que influyen en la reproducción

Factores externos como la temperatura, luz, salinidad y confinamiento juegan un papel importante en la maduración, ovulación y desove, debido a la influencia que tienen sobre la sensibilidad folicular, ya que se requieren señales ambientales precisas para su sincronización (Ekstein 1975, Sower *et al.* 1982, Arantes *et al.* 2010). La temperatura afecta el desarrollo gonadal a través de la acción directa sobre la gametogénesis, la secreción de hormonas hipofisarias, la tasa de depuración hormonal, la respuesta del hígado a los estrógenos y sobre la respuesta de las gónadas a la estimulación (Zanuy y Carrillo 1987), lo cual ha sido demostrado en estudios de atresia folicular inducida por temperatura en el *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). La calidad espectral e intensidad luminosa también puede modificar el desove, ya que se han observado especies con un amplio espectro de respuesta y otras más selectivas donde longitudes de ondas cortas estimulan la maduración de los ovocitos y ondas largas la inhiben (Lam 1983). En *Notemigonus crysoleucas* (Mitchill 1814) la maduración final de los ovocitos y ovulación sólo se presenta en peces expuestos a regímenes de fotoperiodos largos y temperaturas elevadas. Cabe señalar que ambos factores por separado no fueron capaces de inducir la maduración y ovulación en dicha especie (de Vlaming 1975).

1.2.1 Efecto de la temperatura como estímulo en el desove de *Astyanax mexicanus*

Previamente se había reportado que a fin de lograr la maduración de los ovocitos y el desove en poblaciones de *Astyanax mexicanus* mantenidas en cautiverio, el aumento de la temperatura es el estímulo necesario para lograrlo. Simon *et al.* (2019) propone en su experimento que los peces fueron aclimatados a 22°C durante 24 horas y posteriormente se incrementó la temperatura abruptamente a 26°C, lo que provocó el desove. Borowsky (2008) ocho años antes, en su protocolo de reproducción reporta que el desove en sus poblaciones se debió al incremento de la temperatura, donde mantuvo a sus poblaciones a 20°C y un incremento de +4°C de la temperatura provocó el desove.

1.3 Estímulos hormonales

La estimulación hormonal permite mejorar las técnicas de reproducción en especies que no se han estudiado con frecuencia, por ejemplo los peces ciprinidos reofilicos (Kucharczyk 2002; Szabóetal 2002; Krejszefetal 2008). La gonadotropina coriónica humana (hCG) ha sido utilizada en la inducción del desove de algunas especies de peces cultivadas hoy en día (Harvey y Hoar 1980, Rowland 1988) y su éxito por lo general se ha atribuido a una actividad semejante a la LH (Hoar 1969). La ventaja de esta hormona es que actúa directamente sobre la gónada y no requiere la activación de la hipófisis, actuando así mucho más rápido, induciendo la maduración final del ovocito, la espermiación y la puesta; sin embargo, la hCG puede causar inmunorreacciones en el pez receptor, reduciendo o eliminando el efecto de la hormona en inyecciones posteriores (Patiño 1997).

Los métodos más modernos de inducción a la ovulación se han centrado en la aplicación de análogos de GnRH (GnRHa), éstos son monopéptidos que son incapaces de inducir una respuesta inmune y por lo tanto pueden ser usadas en repetidas ocasiones sin que su eficiencia disminuya (Zohar y Mylonas 2001). Además, debido a que la GnRH actúa a un nivel más alto del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, la estimulación inducida con su aplicación puede ser más balanceada, permitiendo una mejor integración de los eventos reproductivos con otras funciones fisiológicas al afectar, directa o indirectamente, la liberación de otras hormonas necesarias para la maduración final de los ovocitos, la ovulación y el desove. Finalmente, gracias a la similitud de la estructura molecular de la GnRH entre especies ícticas, el mismo GnRHa puede utilizarse con éxito en numerosas especies como la carpa (Peter *et al.* 1988), los salmónidos (Estay 1996), la lisa (*Mugil cephalus*) (Lee y Támara 1988), entre otras especies.

Por otro lado, la dopamina es una hormona que actúa a nivel de la hipófisis en algunos peces inhibiendo la liberación de GtH y atenuando la acción de la GnRH en las gonadotropinas (Zohar 1988; Peter y Yu 1997). Por lo tanto, antagonistas de la acción de la dopamina (domperidone, pimozide, reserpine o metoclopramida) han sido utilizadas en combinación con GnRHa en la inducción de la maduración en

algunas especies (Patiño 1997; Zohar y Mylonas 2001), estando bien establecida su efectividad en ciprínidos y algunas especies de agua dulce (Zohar *et al.* 1995).

En un estudio realizado por Jamróz *et al.* (2008) en el que comparó el efecto de tres preparaciones hormonales (Ovaprim, Ovopel y análogos de LH) sobre el desove de *Leuciscus idu* un pez ciprínido, encontró que la ovulación ocurría en el 100% de las hembras estimuladas con Ovaprim, 95% de las hembras estimuladas con Ovopel desovan y el 20% de las hembras estimuladas con análogos de LH desovaron. Por lo tanto en el presente estudio se utilizó Ovaprim, la cual es una mezcla de péptidos líquidos que contiene un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina de salmón (sGnRHa) y un inhibidor de la dopamina (Domperidona). El sGnRHa provoca la liberación de gonadotropinas almacenadas de la pituitaria. El inhibidor de dopamina (Domperidona) sirve para eliminar alguna inhibición de la liberación de GnRH. La liberación de gonadotropinas hipofisarias almacenadas puede ayudar al desove al estimular la ovulación y la espermiación en peces sexualmente maduros (Hoga *et al.* 2018). Para *Astyanax mexicanus* se ha reportado la inducción de tres desoves con implantes hipofisarios (Cahn 1958) y Zeitlin (1973) utilizó gonadotropina coriónica humana (hCG) para inducir el desove en una población de cueva de *Astyanax mexicanus*. Además Brambila-Souzaa *et al.* 2019, en su trabajo con *Astyanax altiparanae* encontró que la estimulación térmica con temperaturas de verano (27°C) aumenta la cantidad de ovocitos vitelogénicos, por otro lado el tratamiento hormonal con GnRHa tiene el mismo efecto cuando se aplica con temperaturas de invierno (20°C), por lo que el rendimiento reproductivo de *Astyanax altiparanae* es mejor con la combinación de la inyección de GnRHa y la exposición a altas temperaturas (27°C).

Debido a que el estímulo térmico es el más utilizado para la maduración gonadal en *Astyanax mexicanus* y además es un método no invasivo, será el primero que se llevará a cabo, en caso de no lograr la maduración gonadal para obtener los ovocitos mediante el desove natural o a través del masaje abdominal, se procederá a utilizar el estímulo hormonal el cual es un método invasivo que asegura la maduración gonadal, ya que activa el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Figura 2). Este eje comienza con la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, la cual actúa en la pituitaria, ésta al ser estimulada libera

dos hormonas, la hormona luteinizante (LH o GtH I) y hormona foliculoestimulante (FSH o GtH II). La GtH I actúa sobre receptores de la célula de la teca en hembras o en receptores de las células de Sertoli en machos; las células de la teca producen testosterona la cual se aromatiza (a través de la aromatasa) para producir estradiol, éste estimula la producción de vitelogenina la cual se une al ovocito. En el caso de los machos, la aromatización de la testosterona permite el inicio de la espermatogénesis. Una vez que se unió la vitelogenina al ovocito, la concentración de GtH I disminuye y la concentración de GtH II aumenta. La GtH II actúa sobre receptores de las células de la granulosa en hembras y sobre receptores de las células de Leydig en machos. En estas células se produce progesterona la cual va a permitir la ovulación en las hembras y la maduración de los espermatozoides en los machos, dando lugar al desove (Redding *et al.* 1993).

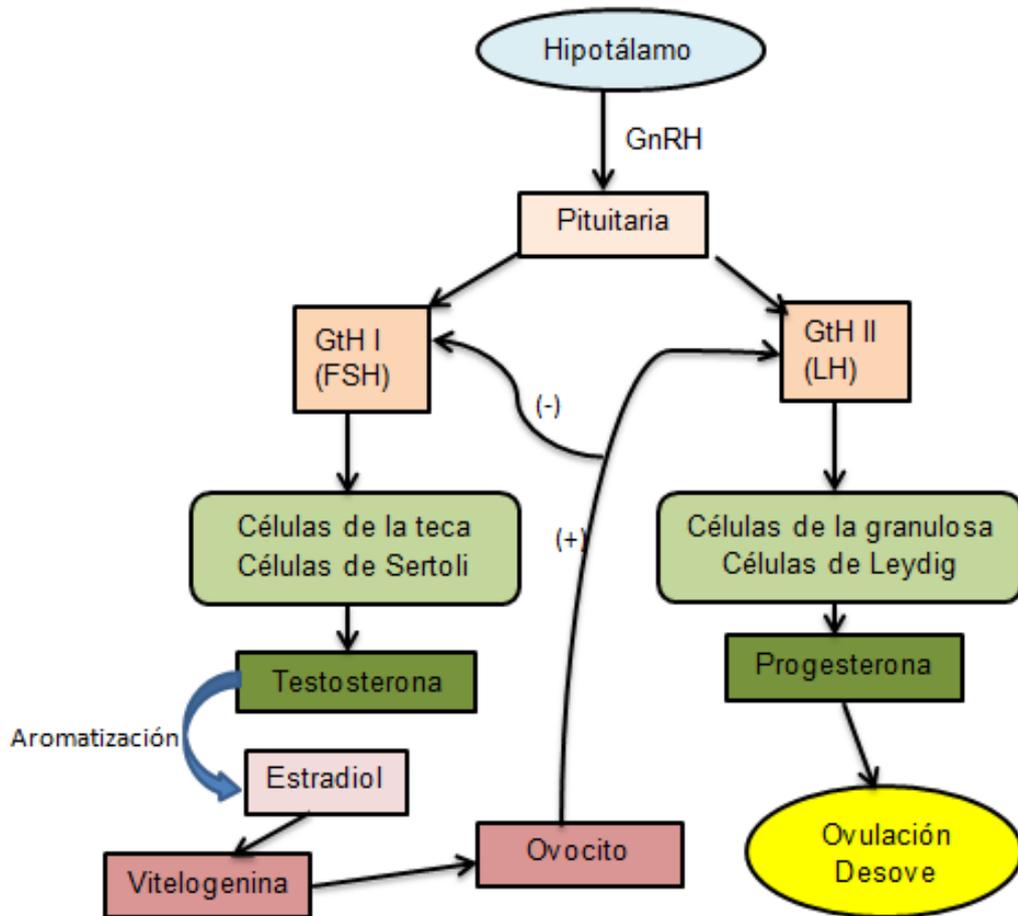


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Inicia con la liberación GnRH en el hipotálamo, la cual estimula la pituitaria para que libere GtH I y GtH II. La GtH I actúa sobre receptores de la célula de la teca y células de Sertoli, produciendo testosterona la cual se aromatiza para producir estradiol, el cual estimula la producción de vitelogenina para que ingrese al ovocito. Una vez que ingresó la vitelogenina al ovocito, la concentración de GtH I disminuye y la concentración de GtH II aumenta. La GtH II actúa sobre receptores de las células de la granulosa y receptores de las células de Leydig. En estas células se produce progesterona la cual va a permitir la ovulación en las hembras y la maduración de los espermatozoides en los machos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto que tienen la temperatura, el fotoperiodo y la aplicación de una combinación de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina de salmón (sGnRHa) y un inhibidor de la dopamina (Domperidona), sobre las características reproductivas (morfología de ovocitos y evaluación espermática) de las poblaciones de cueva y superficie de la sardinita mexicana *Astyanax mexicanus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre la actividad reproductiva de los machos a través de una evaluación espermática de diferentes poblaciones de cueva y superficie de *Astyanax mexicanus*.
2. Estudiar el efecto de la preparación hormonal de sGnRHa de salmón + Domperidona sobre la actividad reproductiva de las hembras de diferentes poblaciones de cueva y superficie de *Astyanax mexicanus*.
3. Realizar la descripción morfológica de los ovocitos de diferentes poblaciones de cueva y superficie de *Astyanax mexicanus*.

3. Hipótesis

1. La temperatura es un factor ambiental determinante en el estímulo de la reproducción de las poblaciones de cueva y de superficie de *Astyanax mexicanus*, por lo que el tratamiento térmico que presente mayor similitud con las condiciones ambientales que sufren ambas poblaciones estimulará la espermatogénesis y ovogénesis.
2. Debido a que en su ambiente natural, las poblaciones troglobias no sufren cambios en su fotoperiodo, las poblaciones mantenidas en condiciones de total oscuridad presentaran un mejor comportamiento reproductivo.
3. Debido a que la GnRH es la hormona determinante para que inicie el proceso reproductivo, los organismos a los que se les aplique la combinación hormonal de sGnRH α de salmón + Domperidona, presentarán un mejor comportamiento reproductivo, comparado con los organismos que no reciban dicha aplicación.

4. Material y métodos

4.1 Poblaciones analizadas

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio húmedo del Instituto de Biología de la UNAM (IBUNAM), bajo la supervisión de la Dra. Patricia Ornelas García, ubicado en Cto. Zona Deportiva S/N, C.U., 04510 Ciudad de México, CDMX. Se trabajó con 4 poblaciones de cueva (Pachón, Tigre, Pichijumo y Vázquez) y 1 población de superficie (Rascón) de *Astyanax mexicanus* (Figura 3), las cuales fueron obtenidas con el permiso emitido por SEMARNAT No. SGPA/DGVS/05389/17. Una unidad experimental (UE) estuvo conformada por dos machos y una hembra. Cada UE se mantuvo en una pecera de 7 L de 28x19x13 cm. Los tratamientos de fotoperiodo fueron asignados aleatoriamente a las UE. Debido al número de organismos con los que se contó solo se pudieron conformar 15 UE. El número de UE por población no fue uniforme. La distribución de UE por población y grupo de fotoperiodos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de unidades experimentales (UE) y número total de organismos que se utilizaron por tratamiento de fotoperiodo.

Población	Fotoperiodo		Organismos N	UE n
	12 H luz	0 H luz		
Tigre	2	3	15	5
Pachón	2	2	12	4
Pichijumo	1	1	6	2
Vázquez	1	1	4	2
Rascón	2	0	4	2
Total	8	7	41	15

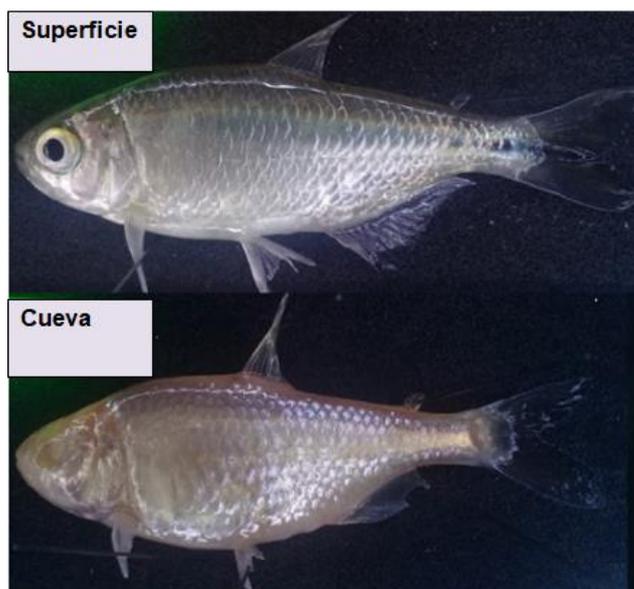


Figura 3. Morfotipo de superficie de la población de Rascón, San Luis Potosí y morfotipo troglobio de la población de Cueva el Pachón, San Luis Potosí de la especie *Astyanax mexicanus*.

Durante todo el experimento se alimentó 5 veces al día a los peces, con una mezcla de artemia (*Artemia salina*) viva y congelada, gusano vivo y congelado, *Daphnia* sp., gusano de sangre seco, hojuela marca Wardley y pasta de hígado (Tabla 2). Además cada semana se llevó a cabo el monitoreo de las variables de calidad del agua: pH, NH₄, NO₂, NO₃ y PO₄, mediante el uso de pruebas colorimétricas (Marca FLUVAL) y utilizando el equipo HANNA modelo HI98194 se midió la conductividad, salinidad y % de oxígeno disuelto.

Tabla 2. Horario de alimentación y tipo de alimento que se proporcionó a los peces durante el experimento.

Hora de alimentación	Alimento suministrado
8 a.m	- <i>Daphnia</i> congelada -Gusano congelado -Hojuela
11 a.m	-Gusano negro (black worm) vivo -Camarón seco -Artemia viva (recién eclosionada) -Artemia congelada
1 p.m	-Gusano negro (black worm) vivo -Camarón seco -Artemia viva (recién eclosionada) -Artemia congelada
4 p.m	-Gusano (black worm) vivo -Artemia viva (recién eclosionada) -Hojuela marca Wardley.
7 p.m	-Pasta de hígado

4.2. Diseño experimental

Se realizó un diseño de bloques aleatorizados con arreglo factorial, en el que el efecto del bloque fue la semana de observación y los factores fueron el fotoperiodo y el tratamiento térmico.

4.2.1. Fotoperiodo: Se utilizaron dos condiciones de fotoperiodo, la primera fue 12 horas luz y 12 horas oscuridad y la segunda fue 24 horas en oscuridad (figura 4). De las 15 unidades experimentales (UE), 8 UE se mantuvieron bajo la primer condición y 7 UE bajo la segunda condición de fotoperiodo.

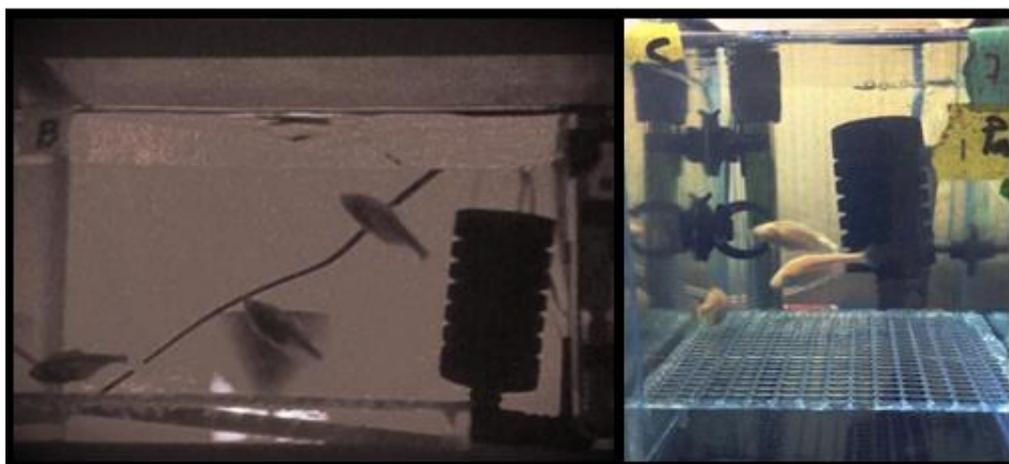


Figura 4. Condiciones de fotoperiodo, a la izquierda se muestra el acuario en total oscuridad y del lado derecho se muestra el acuario mantenido en fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad.

4.2.2. Tratamientos térmicos

En la Figura 5, se describen gráficamente las temperaturas aplicadas en los diferentes tratamientos térmicos que a continuación se describen:

- **Control.** La Temperatura de la pecera se mantuvo estable a 22°C durante toda la semana.
- **Cambio abrupto de temperatura (T1).** El día lunes la temperatura se subió abruptamente a 27°C y se mantuvo por 4 días, para bajarla a 22°C el día viernes.
- **Cambio gradual (T2).** El incremento de temperatura fue gradual, esto es el día lunes se subió a 24°C, el día martes a 26°C, el miércoles se mantuvo en 26°C, el día jueves se bajó a 24°C, y el viernes a 22°C.
- **Cambio intermitente el 4° día (T3).** Incremento puntual con cambios intermitentes de la temperatura el cuarto día de la semana. El día lunes se subió la temperatura de 22°C a 26°C y se mantuvo esta temperatura hasta el día jueves, en este día se realizaron cambios intermitentes de temperatura que consistieron en bajar de 26°C a 20°C (durante 2 horas), se mantuvo a 20°C durante 4 horas, después se subió a 26°C (proceso que duró aproximadamente 2 horas) e inmediatamente se bajó a 20°C e inmediatamente se subió a 26°C. El día viernes se bajó de 26°C a 22°C.

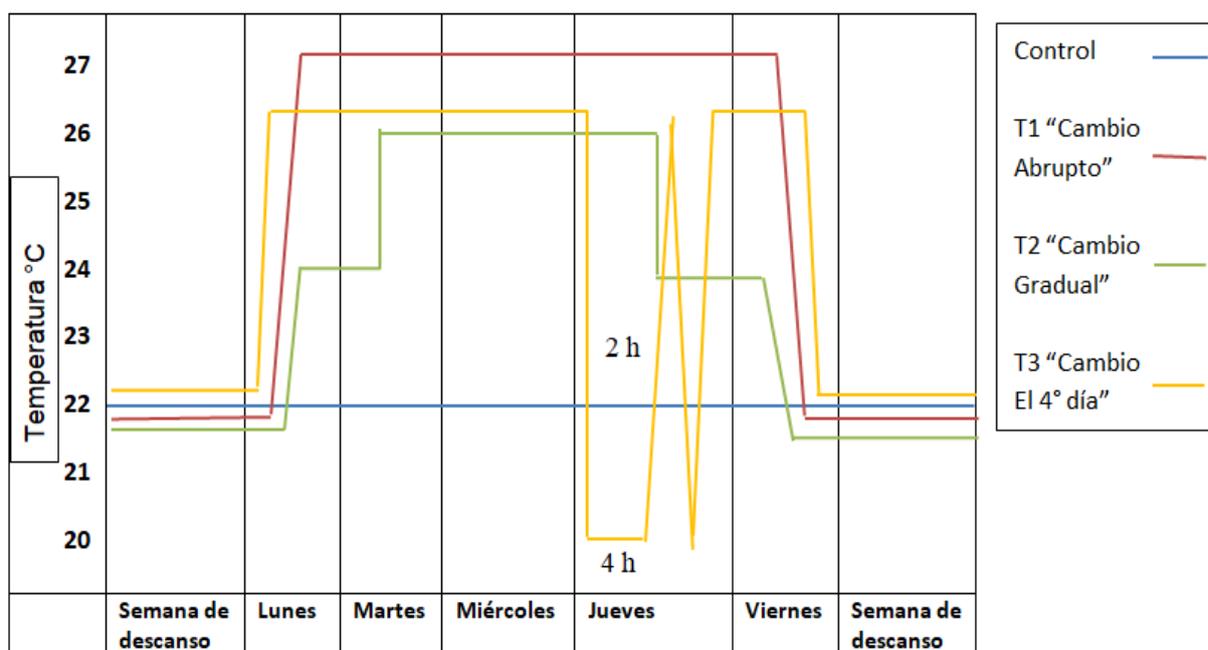


Figura 5. Representación de los cambios de temperatura que se realizaron en cada tratamiento térmico. En el caso del T3, 2h hace referencia al tiempo que tardó en bajar la temperatura y el 4h hace referencia al tiempo en que se mantuvo a esa misma temperatura.

El estudio se llevó a cabo durante 8 semanas, cuatro semanas de aplicación de tratamientos y entre cada una de ellas se dejó una semana de descanso para eliminar el efecto residual del tratamiento térmico. Una semana antes del inicio de cada experimento la temperatura de los acuarios se mantuvo a 22°C. Una vez aplicados los tratamientos térmicos correspondientes y terminada la evaluación de esa semana, se reasignaron los tratamientos como se muestra en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Asignación de tratamientos térmicos por semana en las diferentes poblaciones.

Tratamiento Semana	Control	T1	T2	T3
1	Pichijumo Rascón 1 Pachón 2	Pachón 1 Pachón 2 Tigre 1 Tigre 1 Pachón 1	Tigre 2 Rascón 2 Tigre 2 Pichijumo	Vázquez Tigre 3 Vázquez
2	Pachón 1 Tigre 1 Tigre 1 Tigre 3	Tigre 2 Rascón 2 Tigre 2 Pichijumo	Vázquez Rascón 1 Vázquez	Pachón 2 Pichijumo Pachón 1 Pachón 2
3	Pachón 2 Rascón 2 Pichijumo Pachón 1	Vázquez Rascón 1 Tigre 3 Vázquez	Tigre 1 Pichijumo Tigre 1 Pachón 2	Pachón 1 Tigre 2 Tigre 2
4	Tigre 2 Vázquez Tigre 2 Vázquez	Pichijumo Pachón 2	Pachón 1 Pachón 2 Tigre 3 Pachón 1	Rascón 1 Rascón 2 Tigre 1 Tigre 1 Pichijumo

Las UE de color azul corresponden a las poblaciones mantenidas con fotoperiodo de 12 hrs. luz/12 hrs. oscuridad y las UE de color negro corresponden a las poblaciones mantenidas en total oscuridad.

4.3. Aplicación de Ovaprim

De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación del fotoperiodo y de los diferentes tratamientos térmicos sobre la actividad reproductiva de machos y hembras de *Astyanax mexicanus*, se decidió mantener a las poblaciones de las hembras que no se encontraron reproductivas (Pachón, Pichijumo y Rascón) bajo el fotoperiodo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad para posteriormente aplicarles la combinación hormonal de sGnRHa+Domperidona (Ovaprim); después de aplicar la hormona, se subió la temperatura utilizando el T1 (cambio abrupto de temperatura). Además se decidió agregar al experimento 3 poblaciones más (Escondido, Caballo Moro y Bocatoma). La dosis de hormona que se utilizó fue la recomendada por el fabricante de 0.5 µl por cada gramo de peso, se calculó un peso promedio de 4 gr por lo que se utilizó 2 µl de Ovaprim, ya que la hoja de referencia menciona que podría producir algunos efectos adversos como necrosis, enrojecimiento o blanqueamiento de la zona de aplicación, se decidió diluir la dosis con 8 µl de

solución salina (SS) dando un volumen final de 10 μ l. Para aplicar la dosis, primero se anestesió al pez con agua fría con hielo, una vez anestesiado, se colocó al pez sobre la palma de la mano izquierda en posición decúbito lateral derecho y se sujetó con el dedo pulgar para tener mayor firmeza al momento de la inyección, posteriormente se aplicó la dosis (10 μ l) en la zona de la base de la aleta dorsal (zona con mayor cantidad de músculo) colocando la aguja en dirección contraria a las escamas, para ello se utilizó una jeringa Bd ultra-fine de insulina de 0.3 ml calibre 31G x 6 mm (Figura 6)



Figura 6. Administración de la hormona en la base de la aleta dorsal, con el pez previamente anestesiado sujetándolo con el dedo pulgar apoyándolo sobre la palma de la mano para tener mayor firmeza al momento de la inyección.

4.4. Obtención y evaluación de gametos en microscopía electrónica y óptica.

Cinco días después de aplicar el tratamiento térmico, se obtuvieron los gametos (ovocitos y espermatozoides) para cada ejemplar, para lo cual fue necesario llevar a cabo un masaje abdominal. El procedimiento consistió en anestesiarse al pez con agua y hielo (aproximadamente 7 °C) como se muestra en la figura 7-A, posteriormente para la obtención de los ovocitos y eyaculado se realizó un masaje abdominal en dirección cráneo-caudal, como se muestra en la figura 7-C, el eyaculado se recolectó con un capilar para hematocrito (figura 7-D) para posteriormente realizar el frotis con la tinción de vitalidad, para ello se colocó el eyaculado recolectado (2 μ l) sobre un portaobjetos y se agregó 2 μ l de agua del estanque sobre el eyaculado para que se activaran los espermatozoides y se extendiera su flagelo, se debe dejar actuar por 1 minuto para que el flagelo quede

casi recto; si se deja más tiempo, el flagelo comienza a enrollarse y queda sobrepuesto con los flagelos de los demás espermatozoides impidiendo su evaluación; si se deja menos de un minuto, el flagelo no se extiende y puede confundirse el espermatozoide con una célula inmadura. Después de que haya pasado el minuto, se colocan 2 μ l de la tinción de vitalidad de eosina-nigrosina sobre el eyaculado con agua y se homogeniza con ayuda de otro portaobjetos, con el cual se realizó el barrido para el frotis, posteriormente se dejó secar el frotis a temperatura ambiente (figura 8). Una vez recolectados los ovocitos, éstos se fijaron en una solución de glutaraldehído al 0.625% en un Buffer de fosfato, pH 7.4.

Una vez realizados los frotis y tinción del eyaculado, se evaluó el porcentaje de células vivas, muertas e inmaduras, para ello se observaron las laminillas en el microscopio óptico con el objetivo de 100x utilizando aceite de inmersión, debido al tamaño de los espermatozoides (10 μ m a 15 μ m); se realizó una modificación del procedimiento de Álvarez *et al.* 2009, la cual fue contar 100 células totales en diferentes campos de la laminilla y de esas 100 células se determinaron cuantas eran inmaduras y cuántas eran vivas y muertas; en el caso de que en un macho se obtuvieran más de una laminilla (frotis), se contó 100 células de cada laminilla.

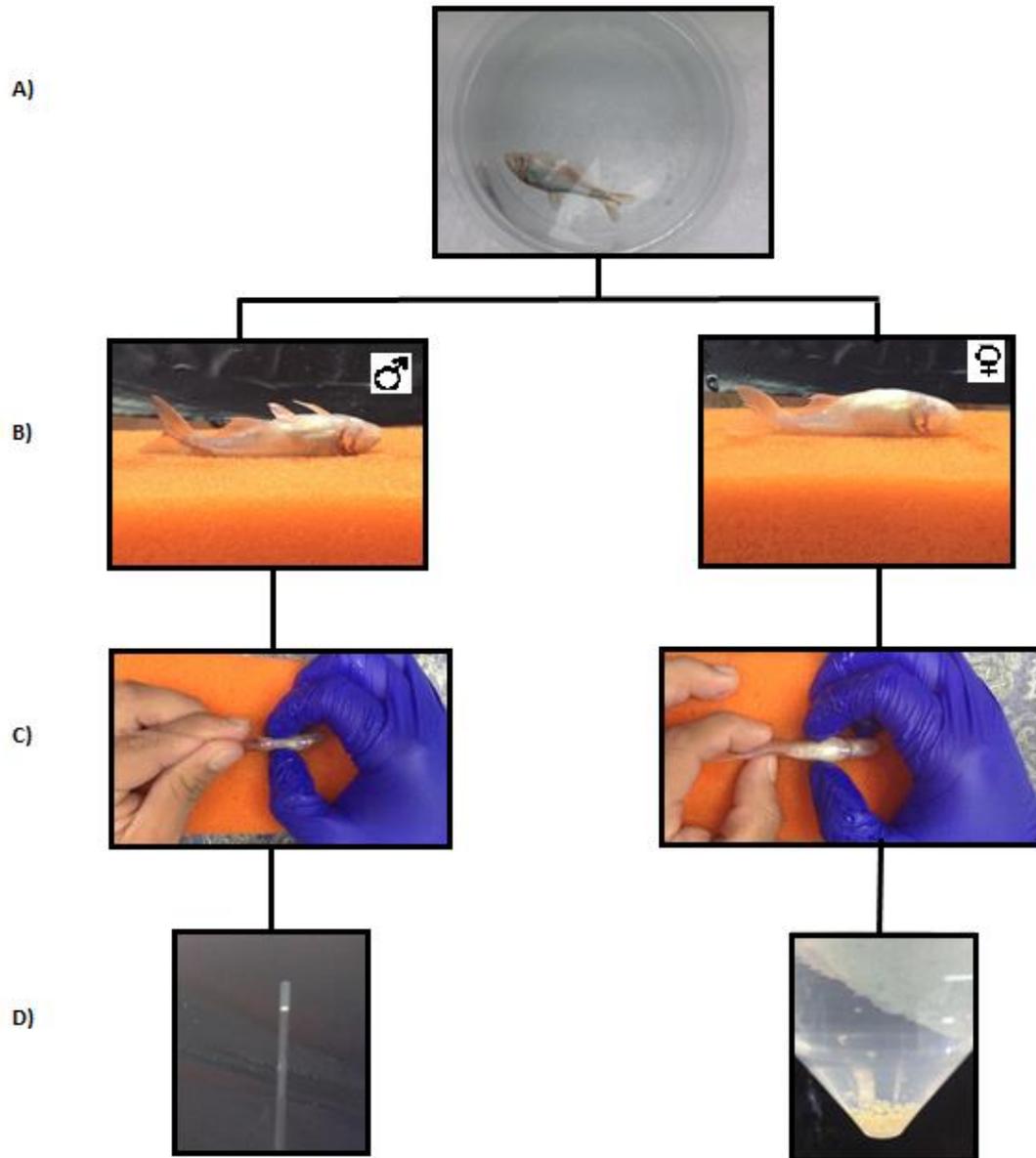


Figura 7. Procedimiento de obtención de gametos. A) pez anestesiado con agua fría y hielo. B) colocación del pez sobre una esponja húmeda para evitar descamación. C) masaje abdominal en dirección cráneo-caudal. D) obtención del eyaculado con un capilar y ovocitos fijados en una solución de glutaraldehído al 0.625% en un Buffer de fosfato, pH 7.4.

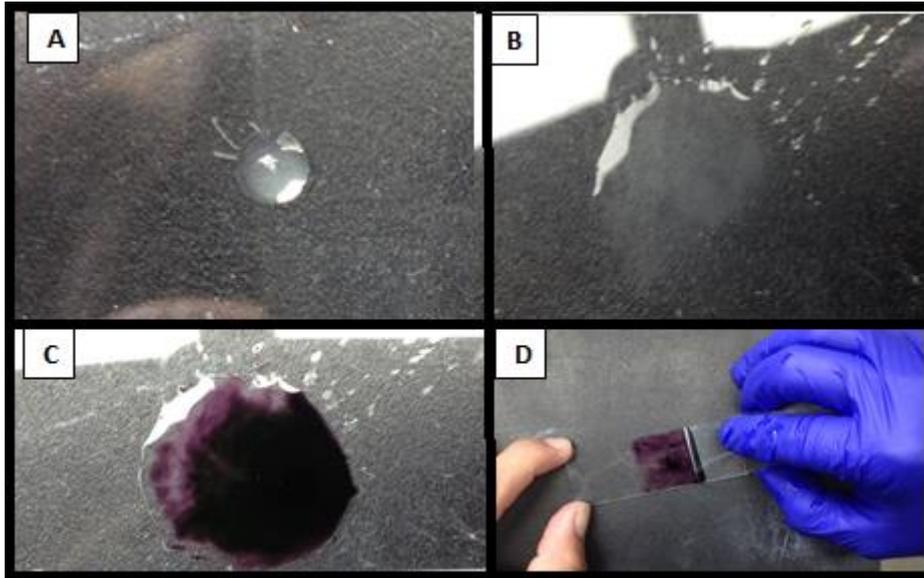


Figura 8. Procedimiento para realizar el frotis del eyaculado. A) se coloca una gota de eyaculado. B) se agrega una gota de agua del acuario y se deja actuar por 1 minuto. C) se agrega una gota de la tinción de vitalidad de eosina-nigrosina. D) se mezcla y se realiza el barrido para realizar el frotis.

En el caso de los ovocitos, se prepararon para su visualización en el microscopio electrónico de barrido (MEB), para evaluar la forma, el tamaño y la presencia de estructuras que conforman al ovocito. Por lo tanto los ovocitos ya fijados en glutaraldehído al 0.625% durante 24 horas, fueron deshidratados con 10 lavados de etanol: agua destilada a diferentes concentraciones, comenzando el primer lavado con 10% de alcohol: 90% agua destilada, posteriormente en cada lavado, se aumentó la concentración de alcohol 10% más, es decir, la concentración de alcohol del segundo lavado fue de 20%, después 30% y así sucesivamente hasta llegar al décimo lavado con 100% de alcohol. Posteriormente se realizó el secado a punto crítico y las muestras fueron recubiertas en oro para finalmente observarlas en el MEB SV 1510. Las fotografías tomadas se analizaron con el programa ImageJ para obtener las medidas de las siguientes estructuras que conforman al ovocito:

- Micrópilo: Se midió el diámetro del micrópilo de las diferentes fotografías que se obtuvieron.
- Corion: Se midió el grosor del corion, para ello de las diferentes fotografías que se obtuvieron se decidió medir cinco diferentes puntos del corion.

- Poros: Se midió la distribución de los poros, para ello con ayuda del programa imageJ versión 1.8.0_112 para Windows, se realizó una cuadrícula sobre la fotografía, cada cuadrante midió $10 \mu^2$, y se estableció el siguiente procedimiento para realizar el conteo del número de poros; se contaron solo cinco cuadrantes que se visualizarán completos, los cuatro de las esquinas superiores e inferiores y el central. El criterio para contar fue solo contar los poros que estuvieran dentro del cuadrante y todos aquellos que tocaran la línea derecha e inferior del cuadrante; todos los poros que tocaran la línea izquierda y superior del cuadrante no se contaron, cabe mencionar que debido a la superficie estriada del ovocito, hubo fotografías en las que no se apreciaban claramente los poros como se muestra en la Figura 9.

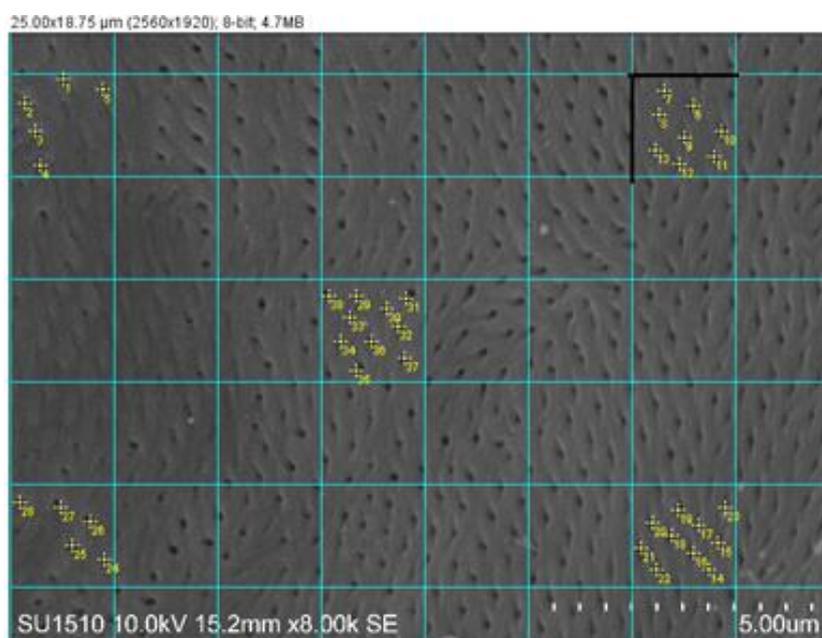


Figura 9. Representación gráfica del conteo de los poros del corion del ovocito. Cada cuadrante mide $10 \mu^2$, los poros que tocan las líneas negras (límite superior e izquierdo) no se contabilizaron. Los cuadros con puntos amarillos son los que se contabilizaron, cada punto amarillo corresponde a un poro.

5. Análisis estadístico

Con la finalidad de reducir el número de variables de calidad del agua, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el programa PAST versión 2.17, para ello, primero se realizó la prueba de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) para comprobar si se podía realizar el PCA, el resultado de esta prueba entre más cercano a 1 se encuentre, mayor relación entre las variables existe y por lo tanto, es procedente realizar el PCA. Adicionalmente se llevó a cabo la estadística descriptiva de las variables de calidad del agua, las cuales se expresaron como Media \pm Desviación estándar y finalmente se graficó la media de cada variable, separándolas por semana y por condición de fotoperiodo (12/12 horas luz/oscuridad y total oscuridad).

Para evaluar el efecto del tratamiento térmico y el fotoperiodo, se utilizó como variable de respuesta el estado reproductivo de los machos (0=no reproductivo, 1=reproductivo), para ello se empleó un análisis de modelo lineal generalizado el cual permite utilizar variables con distribución no normal y heterogeneidad de varianzas (McCullagh y Nelder, 1989). Para determinar el uso de este modelo, se utilizó el Criterio de Información de Akaike corregido para muestras finitas (AICC) el cual está implementado en los procedimientos GLIN del paquete estadístico SPSS 20 (IBM Corp, 2011).

Por tener un número reducido de observaciones para la evaluación de gametos (espermatozoides y ovocitos) en microscopía electrónica y óptica solo se obtuvieron estadísticas descriptivas de mínimo (Min.), máximo (Max.) y mediana (Me). Para medir el área de la cabeza de los espermatozoides se utilizó el programa ImageJ versión 1.8.0_112 para Windows, para ello se contaron 100 células y se obtuvieron estadísticas descriptivas de mínimo (Min.), máximo (Max.) y mediana (Me).

6. Resultados

6.1 Análisis de componentes principales de las variables de calidad del agua.

Los resultados de la prueba de Kaiser-Meyer-Olkin ($KMO=0.63$) mostraron que se podía realizar el PCA. Para seleccionar el número de componentes a utilizar, se utilizó el criterio de eigenvalor mayores a 1, encontrando que los tres primeros componentes acumularon el 72% de la variación de los datos (Anexo 1); sin embargo al realizar la rotación VARIMAX se observó que el primer componente principal (CP1) contenía al nitrato, nitrito, amonio, pH y oxígeno disuelto, el segundo componente principal (CP2) incluía a la salinidad y conductividad y el tercer componente principal (CP3) solo incluía al fosfato, por lo tanto, éste fue eliminado obteniendo que los dos primeros componentes acumularon el 66.5% de la varianza (Anexo 2). En la figura 10 se presentan las puntuaciones (scores) de los dos primeros CP así como la dirección y dimensión de los vectores de las variables, donde se observa que el primer componente principal separa a los nitritos y nitratos de los demás, mientras que el segundo Componente Principal separa a la salinidad y conductividad del resto de las variables. Además, se observa que en la semana 2, las unidades experimentales (representadas por cuadros rojos) se conglomeran cerca del vector de los nitritos y nitratos y en la semana 4, las unidades experimentales (representadas por taches morados) se observan más cerca del vector de salinidad y conductividad; en la semana 1 las UE (representadas con rombos azules) se acercan al vector de pH y finalmente en la semana 3, las UE (representadas con triángulos verdes) se observan más cerca del vector de amonio (NH_4).

Las estadísticas descriptivas de las variables de calidad del agua se presentan en la tabla 4, en la cual se puede observar que los valores de la salinidad y conductividad aumentaron conforme pasó el tiempo, este efecto se puede ver gráficamente en el anexo 5 y anexo 6. Por otro lado, los nitritos y nitratos aumentaron en la semana 2, efecto que se puede observar en las gráficas del anexo 3 y anexo 4. Finalmente estos valores obtenidos se pueden considerar como ideales para llevar a cabo la reproducción de *Astyanax mexicanus* en cautiverio.

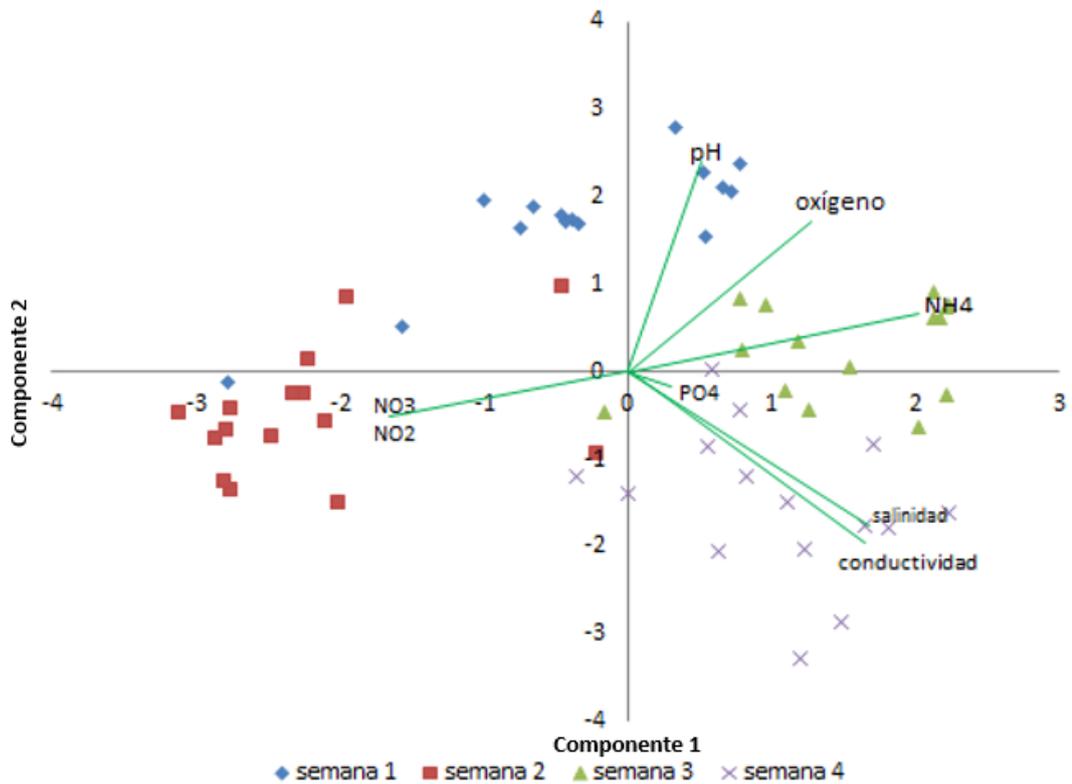


Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA). Las líneas verdes indican la dirección y dimensión de las variables fisicoquímicas, nitratos (NO_3), nitritos (NO_2), amonio (NH_4), fosfatos (PO_4), pH, conductividad, salinidad y oxígeno disuelto. Se puede observar que en la semana 2 las UE (cuadros rojos) presentaron mayor cantidad de nitratos y nitritos, por otro lado, en la semana 4 las UE (cruces moradas) presentaron mayor conductividad y salinidad.

Tabla 4. Medias \pm desviaciones estándar, separadas por semana y fotoperiodo.

Fotoperiodo	Semana	pH	NO2	NO3	NH4	PO4	Cond.	Sal.	O2
12 H luz /12	1	7.3 \pm 0.1	1.1 \pm 1.2	9.4 \pm 12.4	1.4 \pm 1.02	0.9 \pm 0.2	439 \pm 5.4	0.21 \pm 0	35.9 \pm 5.9
H oscuridad	2	6.8 \pm 0.4	2.8 \pm 2.4	20.6 \pm 13.2	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	444.7 \pm 7.3	0.21 \pm 0.007	28.5 \pm 4.2
	3	7.1 \pm 0.3	1.6 \pm 2.2	8.7 \pm 5.2	1.9 \pm 0.6	0.7 \pm 0.3	472.2 \pm 7	0.23 \pm 0.003	51.1 \pm 3.3
	4	6.7 \pm 0.4	0.1 \pm 0.1	5 \pm 0	1.5 \pm 0.7	0.6 \pm 0.3	471.6 \pm 15.4	0.23 \pm 0.007	23.4 \pm 4.2
Total	1	7.4 \pm 0	0.5 \pm 0.5	5 \pm 0	1.9 \pm 1.2	0.6 \pm 0.3	435.1 \pm 7.6	0.21 \pm 0	44.3 \pm 3.8
oscuridad	2	6.7 \pm 0.2	3.2 \pm 2.2	30 \pm 13	0.7 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	444.1 \pm 6.1	0.21 \pm 0.004	26.9 \pm 2.4
	3	7.2 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1	5 \pm 0	1.9 \pm 0.7	0.7 \pm 0.3	471 \pm 4.5	0.22 \pm 0.007	49.2 \pm 2.7
	4	6.8 \pm 0.2	0.03 \pm 0.09	5 \pm 0	1.5 \pm 0.5	0.8 \pm 0.3	477.7 \pm 14.5	0.23 \pm 0.005	31.7 \pm 1.5
General		7\pm0.2	1.2\pm1.1	11.1\pm5.5	1.4\pm0.6	0.7\pm0.3	456.9\pm8.5	0.22\pm0.004	36.4\pm3.5

Las variables de calidad del agua son: nitritos (NO₂), nitratos (NO₃), amonio (NH₄) y fosfato (PO₄) expresados como mg/L, conductividad (Cond.) expresada como μ s/cm, salinidad (Sal.) expresada como psu y oxígeno disuelto (O₂) expresado en porcentaje.

6.2 Efecto de temperatura y fotoperiodo

Los resultados del tratamiento térmico fueron analizados por el número de machos reproductivamente activos, esto es, se evaluó a los 26 machos del experimento, y se encontró que en la semana 1, 10 machos (38.5%) estaban reproductivos, en la semana 2 y 3 menos del 16% de los machos estaban reproductivos y en la semana 4 el 61.5% de los machos se encontraron reproductivos (Anexo 11). En cuanto a la proporción de machos reproductivos el 37% correspondió a la población de Pichijumo, seguido de Rascón con el 25% y Tigre con 21%, siendo solo el 17% para Pachón y sin machos reproductivos para Vázquez (Figura 11).

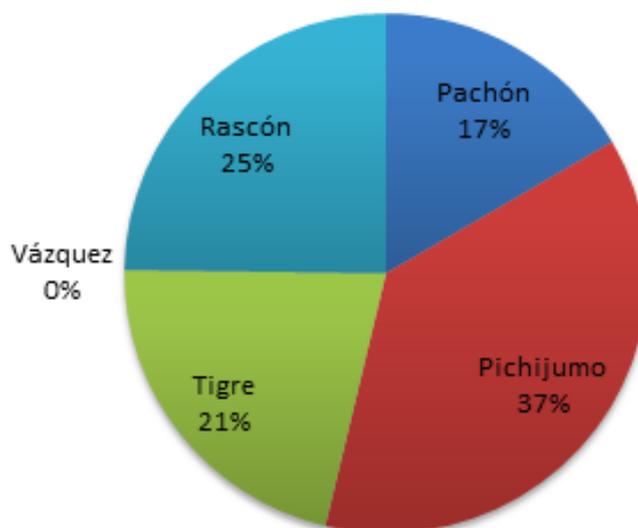


Figura 11. Porcentaje de machos que se encontraron reproductivos, donde se observa que la población de Pichijumo presentó mayor porcentaje de machos reproductivos en comparación con la población de Vázquez que no presentó ningún macho reproductivo.

Ya que en general se observó que en promedio el 38% de los machos reproductivos se encontraban bajo la condición de fotoperiodo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad, en comparación con la condición de total oscuridad que en promedio presentó 18% de machos reproductivos χ^2 de Wald(1)=4.4, $p=0.035$). En el Anexo 12 se presentan los intervalos de confianza al 95%.

El mayor porcentaje de actividad reproductiva de los machos se observó en el tratamiento 3, aunque no fue diferente de los demás tratamientos (χ^2 de Wald(3)=1.13, $p=0.769$), en la tabla 5 se presentan las medias y los intervalos de confianza al 95% de Wald.

Tabla 5. Medias marginales de población del porcentaje de machos activos reproductivamente de acuerdo a la Temperatura.

Temperatura	Media	Error estándar	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
.0	.24	.094	.10	.46
1.0	.22	.091	.09	.44
2.0	.26	.095	.12	.48
3.0	.36	.108	.18	.59

(χ^2 de Wald(3)=1.13, p=0.769)

6.3 Evaluación espermática

6.3.1 Viabilidad espermática: A partir de un volumen de 2 μ l de eyaculado que se recolectó por macho, se llevó a cabo la evaluación de viabilidad espermática, esto es, se realizó la tinción de vitalidad (figura 12) de eosina-nigrosina (1:1 v:v), con la cual se encontró que la población de superficie de Rascón presentó mayor porcentaje de viabilidad (espermatozoides vivos) con una Mediana (Me) de 99% y la población troglobia de Pachón presentó el menor porcentaje de viabilidad con una Me=8% de espermatozoides vivos; por otro lado la población troglobia de Vázquez fue la que presentó mayor porcentaje de células inmaduras con una Me=95% y una talla de 4.15 cm; las poblaciones de Pachón, Pichijumo y Rascón presentaron el menor porcentaje de células inmaduras (Me=1% cada una de ellas), además presentaron una talla de 6 cm, 6.4 cm y 6.55 cm respectivamente; la talla de la población de Tigre fue de 5.9 cm y su porcentaje de células inmaduras igual fue bajo con una mediana (Me) de 3% (Tabla 6).

6.3.2 Área de la cabeza de los espermatozoides: Se encontró que el área de la cabeza de los espermatozoides fue mayor en la población troglobia de Pachón (Me=9.19 μ m), seguida de Vázquez (Me=7.16 μ m), Pichijumo (Me=5.84 μ m) y Tigre (Me=5.54 μ m), dejando a la población de superficie de Rascón con la menor área de la cabeza del espermatozoide (Me=4) (Tabla 6).

Tabla 6. Evaluación espermática de las 4 poblaciones troglobias y la población de superficie de *Astyanax mexicanus*.

Población	Estadísticos	Viabilidad espermática			Peso (gr)	Talla (cm)	Área de la cabeza del espermatozoide
		% vivos	% muertos	% inmaduros			
N			5		8		100
Pachón	Min.	1	2	0	2.81	5.5	4.41
	Me	8	89	1	3.15	6	9.19
	Max.	98	97	10	3.52	6.3	15.82
N			16		10		100
Tigre	Min.	0	0	0	2.43	5.6	2.41
	Me	80	13	3	2.85	5.9	5.54
	Max.	100	100	12	4.1	7	12.89
N			1		2		100
Vázquez	Min.				1.02	4	4.9
	Me	3	2	95	1.05	4.15	7.16
	Max.				1.07	4.3	9.79
N			15		4		100
Pichijumo	Min.	18	0	0	2.45	5.9	3.16
	Me	75	21	1	3.4	6.4	5.84
	Max.	100	82	9	3.45	6.7	12.14
N			3		2		100
Rascón	Min.	99	0	1	3.21	6.5	2.74
	Me	99.5	0	1	3.37	6.55	4
	Max.	100	0	1	3.53	6.6	6.33

El primer valor de "N" en negritas representa al número de frotis teñidos con eosina-nigrosina que fueron evaluados para esa población; el segundo valor indica el número de machos que se midieron y pesaron y finalmente el tercer valor de "N" indica el número de células (espermatozoides) analizadas para la población. Los estadísticos son mínimo (Min.) Mediana (Me) y Máximo (Max.).

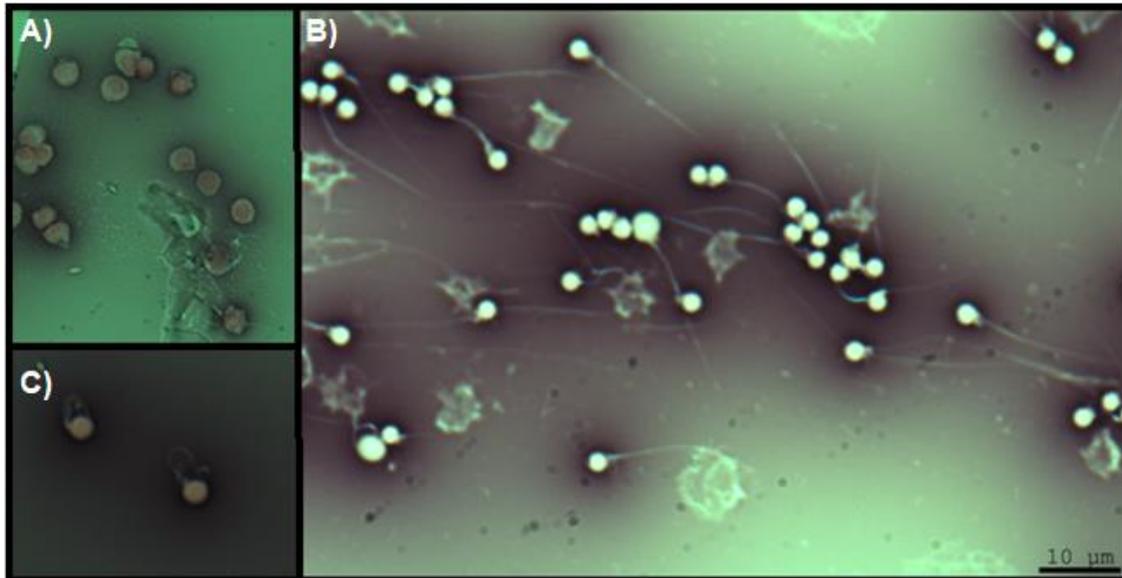


Figura 12. Tinción de vitalidad de eosina-nigrosina. A) Células inmaduras, se observan teñidas de color rosa con un pequeño halo blanco alrededor de ellas y no se logra observar el flagelo. B) Espermatozoides vivos, se observa completamente blanco el espermatozoide con el flagelo extendido. C) Espermatozoides muertos, se observa el espermatozoide teñido de color rosa.

6.4 Descripción morfológica de los ovocitos

Durante las cuatro semanas de estimulación térmica, solo se logró obtener ovocitos de una hembra de la población troglobia de Vázquez y una hembra de la población troglobia de Tigre. De la población troglobia de Vázquez se obtuvieron 38 ovocitos y de la población de Tigre se obtuvieron 14 ovocitos. De las poblaciones a las que se les aplicó la hormona (Ovaprim), que fueron las poblaciones de Pachón, Pichijumo y Rascón se obtuvieron 450, 484 y 0 ovocitos respectivamente; y de las poblaciones que se agregaron al experimento (Escondido, Caballo Moro y Bocatoma) se obtuvieron 958, 60 y 950 ovocitos respectivamente (Tabla 7).

En la evaluación de MEB se identificaron los ovocitos de forma esférica con una superficie estriada, con las siguientes estructuras: el ooplasma o yema, el corion formado por poros y una membrana externa igual formada por poros que recubre a todo el corion, en la parte del polo del ovocito se hacen más notables las estrías que salen del micrópilo (espacio por donde ingresa el espermatozoide ya que éste carece de acrosoma) (figura 13).

Tabla 7. Medias evaluadas de las diversas estructuras que conforman al ovocito de *Astyanax mexicanus*.

Población	Número de ovocitos recuperados	Estadístico	Diámetro del ovocito (μm)	Diámetro del micrópilo (μm)	Grosor del corion (μm)	Número de poros por $10\mu\text{m}^2$
Sin hormona						
N			13	7	15	5
Tigre	14	Min.	460.5	3.6	1.2	4
		Me	611.6	4.5	1.4	4.5
		Max.	684.6	5.6	2.3	5
N			9	7	10	5
Vázquez	38	Min.	589	4.7	1.13	7
		Me	635.3	7.1	1.4	8
		Max.	690.9	8.2	1.5	9
N			0	0	0	0
Rascón	0	Min.	0	0	0	0
		Me	-	-	-	-
		Max.	-	-	-	-
Con hormona						
N			7	0	0	5
Pichijumo	484	Min.	517.5	0	0	5
		Me	587	-	-	8
		Max.	694.8	-	-	12
N			13	5	10	5
Pachón	450	Min.	558	4	1.1	5
		Me	679.8	5.3	1.5	8
		Max.	730	9.1	1.8	10
N			8	2	10	5
Bocatoma	950	Min.	579.9	12.3	0.8	12
		Me	845.5	12.9	1	14
		Max.	1058.3	13.5	1.3	20
N			8	7	5	5
Escondido	958	Min.	466	3.5	0.8	5
		Me	614.2	4.9	1	8
		Max.	693.2	7.4	1.3	10
N			8	3	10	5
Caballo Moro	60	Min.	237.7	8.3	1.1	30
		Me	572.3	8.3	1.4	34
		Max.	729.5	8.8	1.5	36

El primer valor de "N" en negritas indica el número de fotos del ovocito completo que fueron analizadas; el segundo valor indica el número de fotos del micrópilo que fueron analizadas; el tercer valor indica el número de puntos que se midieron en diferentes fotos del corion y el cuarto valor indica el número de cuadrantes que se contaron para los poros, en este caso para todas las poblaciones fue 5. Los estadísticos son mínimo (Min.), mediana (Me) y máximo (Max.).

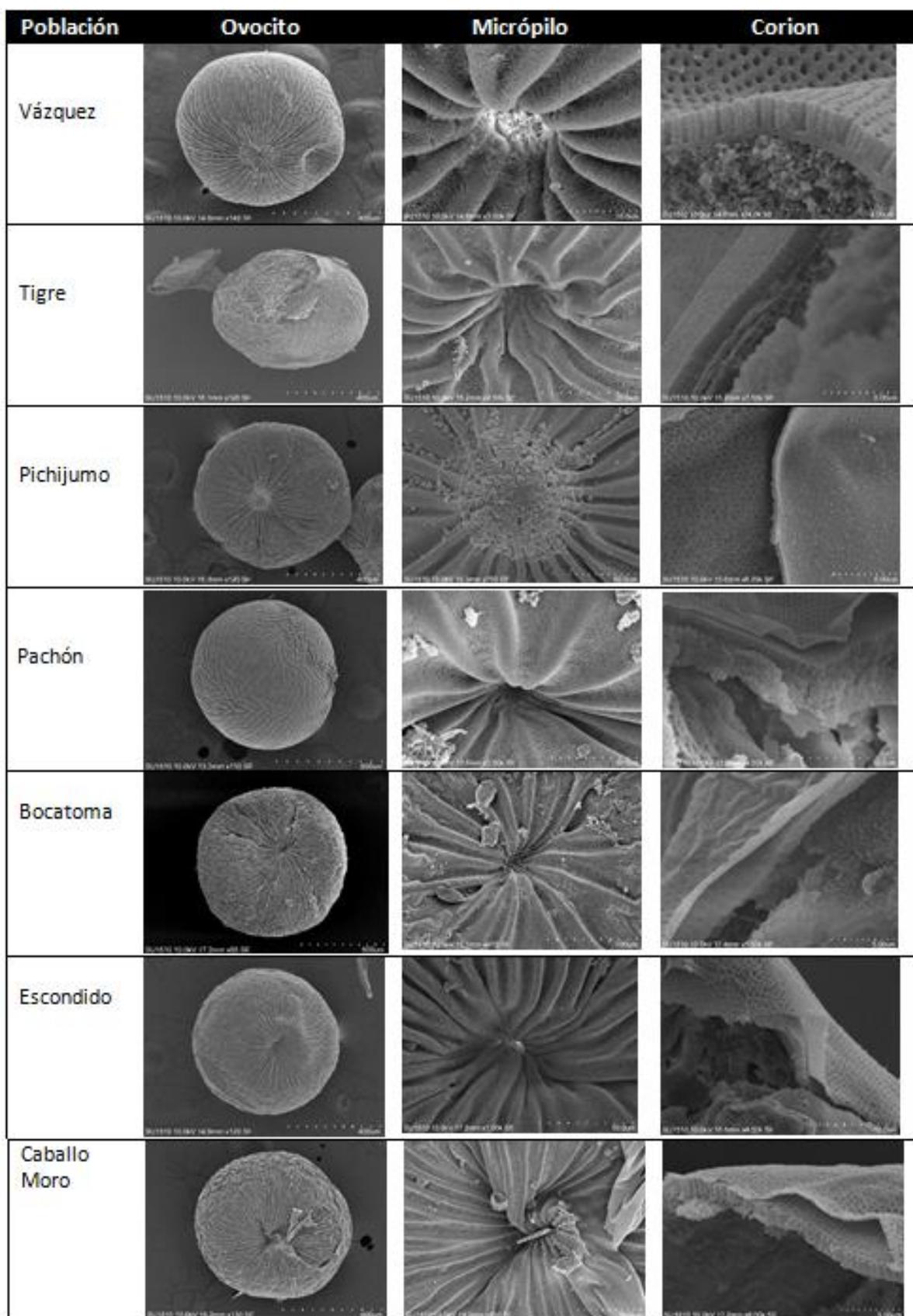


Figura 13. Comparación del ovocito, micrópilo y corion de las diferentes poblaciones troglobias y de superficie de *Astyanax mexicanus*.

Algo que se observó en los ovocitos de todas las poblaciones tanto troglobias como de superficie, fue que los poros que conforman al corion y su membrana externa, se encontraban abiertos, sin embargo en los ovocitos fertilizados de la población troglobia de Pachón y de la población de superficie de Bocatoma, estos poros se encontraban cerrados (Figura 14), además en los ovocitos fertilizados se observó un tapón en la zona del micrópilo, formado por la membrana externa que recubre al corion (Figura 15).

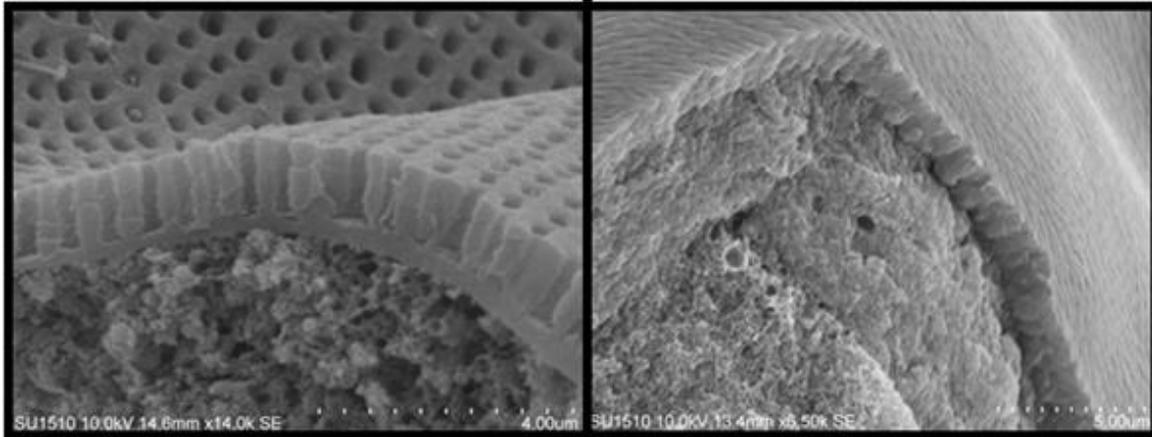


Figura 14. Corion del ovocito antes de ser fertilizado del lado izquierdo y corion del ovocito después de ser fertilizado del lado derecho de la imagen donde se observa que los poros se encuentran completamente cerrados.



Figura 15. Tapón en la zona del micrópilo una vez realizada la fertilización del ovocito.

Otra estructura que se observó en la población de Caballo Moro y en la población de Bocatoma fue la presencia de vellosidades, las cuales se menciona que funcionan para formar el corion y en este caso la membrana externa, ya que en la fotografía de la población de Bocatoma se logran observar por encima del corion y en la fotografía de la población de Caballo Moro se observan junto al ooplasma o yema (Figura 16).

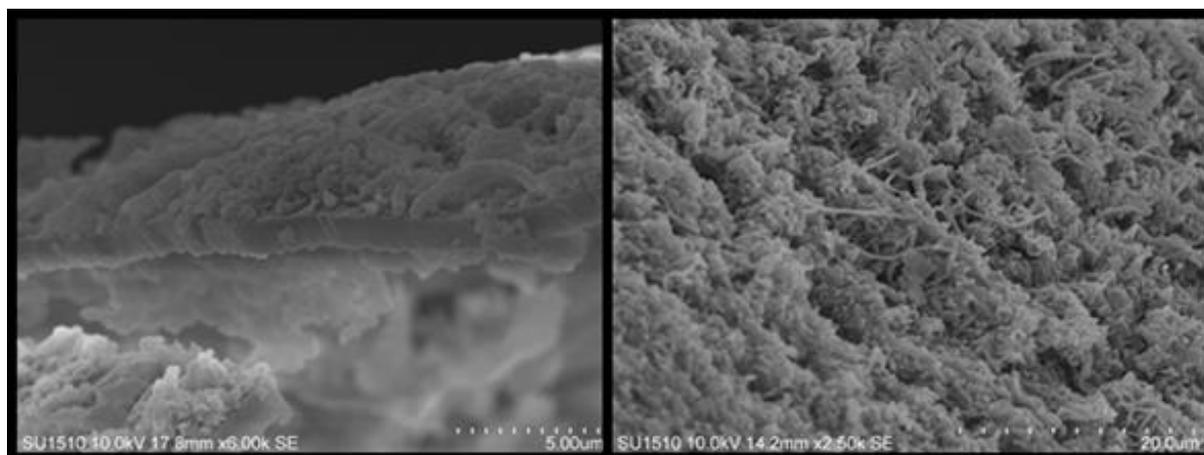


Figura 16. Presencia de vellosidades en los ovocitos. Del lado izquierdo se observan las vellosidades por encima del corion y del lado derecho de la figura se observan las vellosidades de mayor tamaño junto a lo que podría ser el ooplasma.

7. DISCUSIÓN

7.1. Efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre la actividad reproductiva de los machos de diferentes poblaciones de cueva y superficie de *Astyanax mexicanus*, a través de una evaluación espermática

La falta de maduración final de los gametos para que ocurra el desove en los peces de cultivo es consecuencia de la ausencia de las condiciones ambientales que los peces experimentan en su ambiente natural, ya que muchas de las especies comercialmente importantes migran cientos de kilómetros para alcanzar nichos ambientales donde las condiciones son óptimas para la sobrevivencia de su progenie. Durante esta migración experimentan múltiples cambios ambientales, tales como, pH, dureza, temperatura, profundidad, variedad de sustratos, disponibilidad de alimento, entre otros. En el caso de *Astyanax mexicanus*, solo se ha reportado. Los efectos combinados de estos cambios disparan los procesos endocrinos que conducen a la maduración final de los ovocitos y a la ovulación (Stacey 1984). Desafortunadamente muchas especies mantenidas en cautiverio sufren disfunciones reproductivas, principalmente las hembras inician su desarrollo gonadal en forma normal, pero no logran la maduración final del ovocito, la ovulación o el desove (Zohar 1988, Peter *et al.* 1993). Por otro lado los machos a pesar de ser más resistentes al estrés provocado por el cautiverio, producen menor volumen de eyaculado o bien éste es de mala calidad (Billard 1989). Manipulaciones de algunos factores ambientales como el fotoperiodo, temperatura, salinidad, volumen del acuario o la vegetación del sustrato, pueden mejorar la calidad de las puestas (Donaldson y Hunter 1983, Zanuy *et al.* 1995, Donaldson *et al.* 1996, Rodríguez *et al.* 2000, Zohar y Mylonas 2001).

En este estudio se realizó la manipulación del fotoperiodo, observándose un efecto significativo en el fotoperiodo utilizado de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad, lo que comprueba que la intensidad luminosa estimula la gametogénesis de *Astyanax mexicanus*, como se ha mostrado en otras especies como lo son los reproductores silvestres de cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) (Estrada *et al.* 2014), o en el caso de *Cynoscion phoxocephalus* donde se observó que el desarrollo gonadal

aumentaba cuando el fotoperiodo era mayor a 11 hrs. de luz que correspondía con los meses de primavera y verano (Palacios *et al.* 2015).

Además se manipuló la temperatura, la cual afecta el desarrollo gonadal a través de la acción directa sobre la gametogénesis, la secreción de hormonas hipofisiarias, la tasa de depuración hormonal, la respuesta del hígado a los estrógenos y sobre la respuesta de las gónadas a la estimulación (Zanuy y Carrillo 1987), sin embargo, en las poblaciones experimentales de *Astyanax mexicanus* no se observó un efecto significativo en la temperatura, ya que todos los tratamientos térmicos incluyendo el tratamiento control estimularon la espermatogénesis, observándose porcentajes de machos activos muy similares entre los tratamientos (24%, 26%, 22% y 36% en el tratamiento control, T1, T2 y T3 respectivamente). Por lo tanto la temperatura no es estímulo suficiente para la maduración gonadal en *Astyanax mexicanus*, lo cual ya había sido observado por Sadoglu (1979) donde reporta que la temperatura del agua de sus grupos de apareamientos fluctuó entre 19°C y 30°C; además la gran cantidad de protocolos térmicos que se han descrito por otros autores (Borowsky 2008a, 2008b; Rétaux *et al.* 2011, Simón *et al.* 2019, Robert Peuß *et al.* 2019) comprueban que la temperatura no es estímulo suficiente para el desove de *Astyanax mexicanus*, y podría estar sucediendo lo mismo que en otras especies como *Notemigonus crysoleucas*, donde la maduración final de los ovocitos y la ovulación sólo se presenta en peces expuestos a fotoperiodos largos y temperaturas elevadas (Mitchill 1814) y si solo se aplica una de las dos condiciones, no es capaz de producirse la maduración y ovulación en dicha especie (de Vlaming 1975).

En nuestro estudio encontramos que al proporcionar dos condiciones ambientales (temperatura y fotoperiodo), logramos estimular a la mayoría de los machos de las diferentes poblaciones utilizadas (Pichijumo 37%, Rascón 25%, Tigre 21% y Pachón 17%) obteniendo eyaculado, dejando a Vázquez como la única población en la que los machos no se estimularon, esto puede deberse a que aún no alcanzaban la madurez sexual, la cual se presenta a cierta edad y peso del animal, sin embargo al no conocer la edad exacta de los animales, se puede utilizar la talla del animal para hacer la relación de que entre mayor es la talla del animal, mayor es la edad, por lo que observamos que las poblaciones de Rascón,

Pichijumo, Pachón y Tigre presentaron tallas de 6.5 cm, 6.4 cm, 6 cm y 5.9 cm respectivamente y un pesos de 3.37 gr, 3.4 gr, 3.15gr y 2.85 gr respectivamente, muy similares entre ellos, a diferencia de la población de Vázquez que los machos presentaron una talla de 4.15 cm y peso de 1.05 gr. Simón *et al.* 2019 en su experimento reporta una talla de 7.92 ± 0.71 cm para el morfotipo de superficie y 7.40 ± 0.53 cm para el morfotipo de cueva, con lo que se concluye que la talla de los machos de la población de Vázquez no es la adecuada para la reproducción.

Con respecto a los valores de calidad del agua, Rétaux *et al.* (2011) mencionan un pH entre 8.1 y 8.2 y una conductividad entre 470 y 590 $\mu\text{s/cm}$ como idóneos para la reproducción de la especie, en nuestro estudio observamos un pH de 7 ± 0.2 y una conductividad de 456.9 ± 8.5 , ambas variables con valores fuera de los intervalos previamente reportados, sin embargo en las medias por semana (tabla 4), se puede observar que conforme éstas pasaron, la conductividad aumentó, llegando en la semana 4 a un valor promedio de 471.6 ± 15.4 $\mu\text{s/cm}$ para los peces mantenidos en fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y un promedio de 477.7 ± 14.5 $\mu\text{s/cm}$ para los peces mantenidos en total oscuridad, valores que entran dentro del rango reportado por Rétaux *et al.* (2011). Es interesante que los valores más altos de nitritos y nitratos en la segunda semana fueron los que presentan los peores resultados de reproducción, por lo que podríamos sugerir que los nitritos y nitratos podrían limitar la reproducción en la especie. En este sentido nuestro estudio ayuda a comprender a más detalle los valores óptimos para que se lleve a cabo la reproducción de las poblaciones de cueva y superficie de *Astyanax mexicanus* en cautiverio.

La viabilidad de los espermatozoides permite inferir la calidad espermática, al evaluar la integridad de la membrana del espermatozoide (Rurangwa *et al.* 2004). La evaluación de este parámetro permite la predicción de la fertilidad potencial en muestras de semen, ya que una membrana plasmática intacta es necesaria para la fecundación (Chalah y Brillard 1998). La viabilidad de los espermatozoides es ampliamente utilizada para la evaluación de espermatozoides de mamíferos (Garner *et al.* 1995 y BjoÈrndahl *et al.* 2003) pero la prueba de viabilidad espermática en especies acuáticas es limitada. Para *Astyanax mexicanus* es el primer reporte que se establece sobre viabilidad espermática mediante la técnica de tinción con Eosina-

Nigrosina. Esta tinción ha sido ampliamente aplicada en espermatozoides de mamíferos como cerdos, toros, conejos y carneros (Björndahl *et al.* 2003) y en pocas especies acuáticas (Fribourgh 1966; Álvarez *et al.* 2009; Montes 2012). Esta técnica depende de la habilidad y funcionalidad de las membranas, ya que ésta al encontrarse intacta excluye el colorante eosina (Garner *et al.* 1987). Además es una técnica de bajo costo y permite la evaluación tanto de la viabilidad como de la morfología de los espermatozoides, sin embargo la fiabilidad de la técnica disminuye debido a que la población de espermatozoides analizada es relativamente pequeña (aproximadamente 200 espermatozoides) (Klimowicz *et al.* 2012). En nuestra evaluación encontramos que las poblaciones con mejor porcentaje de viabilidad espermática y que podrían ser utilizadas para reproducción son Rascón, Tigre y Pichijumo con 99.5%, 80% y 75% de viabilidad respectivamente, y las poblaciones con menor viabilidad fueron Pachón y Vázquez con 8% y 3% respectivamente, sin embargo un factor que influyó en estos resultados fue el tamaño muestral (n), el cual no fue igual para todas las poblaciones y además solo se contabilizaron 100 espermatozoides; otro factor que debe considerarse son las alteraciones reproductivas producidas por la cautividad que se centran en una reducción de la cantidad y calidad de los gametos producidos, principalmente las hembras inician su desarrollo gonadal en forma normal, pero no logran la maduración final del ovocito, la ovulación y el desove, en el caso de los machos, a pesar de ser más resistentes al estrés producido por el cautiverio producen menor volumen de eyaculado o bien éste es de mala calidad (Billard 1986; Zohar y Mylonas 2001).

Finalmente, el porcentaje de machos reproductivos aumentó con el tiempo, a excepción de la segunda y tercera semana, las cuales presentaron valores menores a la primera semana, estando solo el 16% reproductivos. Consideramos que estos resultados podrían ser el resultado del procedimiento, ya que la primera semana el procedimiento de obtención de gametos fue diferente y no se llevó a cabo la tinción para verificar la proporción de machos reproductivos, sino se utilizó la presencia de un líquido blanquecino cerca del poro una vez que se llevaba a cabo el masaje abdominal, lo que podría haber dado falsos positivos. Una vez con el procedimiento de tinción estandarizado observamos que hubo un incremento de los machos reproductivos conforme pasó el tiempo, posiblemente como resultado al efecto acumulado de la aclimatación, alimentación y los diferentes estímulos ambientales

como el fotoperiodo y el cambio de la temperatura, que podrían estimular la maduración gonadal tanto de machos como de hembras de forma gradual (Estrada *et al.* 2014; Palacios *et al.* 2015).

7.2. Efecto de la preparación hormonal de sGnRHa de salmón + Domperidona (Ovaprim) sobre la actividad reproductiva de las hembras de diferentes poblaciones de cueva y superficie de *Astyanax mexicanus*.

El uso de métodos hormonales comenzó en 1930 con la inyección de extracto crudo de hipófisis de peces maduros (con altos niveles de GtH) con el fin de inducir la puesta (Zohar y Mylonas 2001). Hoy son utilizados varios compuestos sintéticos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa) que aplicados desde simples inyecciones en suero fisiológico hasta en microesferas, que han solucionado numerosos problemas reproductivos en varias especies (Zohar 1988, Van Winkoop *et al.* 1994, Donaldson *et al.* 1996, Patiño *et al.* 2001, Solar 2002, entre otros). En este trabajo se utilizó un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRHa) conocida comercialmente como Ovaprim, observándose que es efectivo para inducir desarrollo ovárico, maduración final de ovocitos, ovulación y desove en *Astyanax mexicanus* al obtener desoves de las poblaciones troglobias de Pachón, Pichijumo y Escondido y la población de superficie de Bocatoma, a las cuales se les fue administrada dicha hormona y combinada con los cambios ambientales de temperatura y fotoperiodo (12 horas luz/ 12 horas oscuridad), se recuperaron 450, 484, 958 y 950 ovocitos fertilizados respectivamente. Además se puede comprobar la eficacia de la hormona al comparar el número de ovocitos que se obtuvieron a través del masaje abdominal de la población de Caballo Moro (60 ovocitos), a la cual se le aplicó la hormona y el número de ovocitos que se obtuvieron a través del masaje abdominal de la población de Tigre (6 ovocitos) y Vázquez (38 ovocitos), a las cuales no se les aplicó la hormona.

El Ovaprim además de tener el análogo de GnRH de salmón (sGnRHa) contiene Domperidona, un antagonista de la dopamina, ésta actúa a nivel de la hipófisis en algunos peces inhibiendo la liberación de GtH y atenuando la acción de la GnRH en las gonadotropinas (Zohar 1988, Peter y Yu 1997), por lo tanto se

combina con GnRHa en la inducción de la maduración en algunas especies (Peter *et al.* 1988, Peter y Yu 1997, Patiño 1997, Zohar y Mylonas 2001), estando bien establecida su efectividad en ciprínidos y algunas especies de agua dulce (Zohar *et al.* 1995), así como en nuestro caso de estudio.

Con estos resultados se puede utilizar la combinación hormonal de sGnRHa+Domperidona (Ovaprim) para inducir la maduración final del ovocito y el desove en *Astyanax mexicanus*. Además se puede utilizar para la obtención de gametos para la hibridación interespecífica, y entre fenotipos a través de la fertilización *In vitro*, para estudios de biología del desarrollo y evaluación de herencia de caracteres.

7.3. Descripción morfológica de los ovocitos de diferentes poblaciones de cueva y superficie de *Astyanax mexicanus*.

El desarrollo de los ovocitos en la mayoría de los teleósteos comprende 5 fases diferentes (Cárdenas *et al.* 2008) las cuales son:

1. **Ovocitos tempranos:** Los ovocitos de **10-25 μm** tienen un núcleo esférico con un solo nucléolo y una cantidad discreta de citoplasma con ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico.
2. **Crecimiento primario:** ovocitos de **25-270 μm** con núcleo esférico en una posición central. Inicialmente, los nucléolos se dispersan por todo el nucleoplasma, pero pronto toman una ubicación más periférica, cerca de la envoltura nuclear. En las últimas fases de esta etapa, el corion (envoltura de la vitelina o zona radiata) comienza a formarse. Se pueden encontrar algunas microvellosidades de ovocitos que alcanzan el espacio extracelular cerca de las células foliculares (granulosa), que son planas y rodean al ovocito en una sola capa.
3. **Crecimiento secundario:** Ovocitos de **270-380 μm** , la etapa comienza cuando se forman los alvéolos corticales y las vesículas lipídicas.

Los alvéolos corticales se encuentran en la corteza periférica. Las microvellosidades de los ovocitos todavía se extienden por todo el corion hacia las células de la granulosa.

4. **Vitelogénesis:** esta etapa se caracteriza por un aumento sustancial en el tamaño de los ovocitos causado por la incorporación de materiales externos dentro de la ooplasma, llegando a medir **380-650 μm** . El corion se vuelve más grueso a medida que se agregan más capas proteicas extragonadales. Las microvellosidades atraviesan los poros del corion y siempre se localizan justo en frente de las células de la granulosa.

5. **Maduración:** el ovocito continúa creciendo (**tamaño de 650-1150 μm**) y el evento principal de esta etapa es la reanudación de la meiosis. Esto comienza con la migración nuclear al polo animal del ovocito. Después de esto, la vesícula germinal se descompone. La yema de proteína sufre desorganización, probablemente debido a la hidrólisis de sus componentes, lo que resulta en una masa irregular que ocupa la mayor parte del área central del ovocito.

De acuerdo con esta clasificación (Cárdenas *et al.* 2008), los ovocitos recolectados de nuestras poblaciones de *Astyanax mexicanus* se encontraban entre la fase de vitelogénesis y de maduración, ya que obtuvimos medidas del diámetro de los ovocitos similares a las etapas antes descritas, sin embargo si se considera la mediana, los ovocitos de las poblaciones de Tigre, Vázquez, Pichijumo, Escondido y Caballo Moro se encontraban en la etapa de vitelogénesis y los ovocitos de las poblaciones de Pachón y Bocatoma se encontraban en la etapa de maduración.

Kaviani *et al.* 2013 da la misma clasificación de las etapas de maduración de los ovocitos en el pez cebra (*Danio rerio*), por lo que al comparar a *Astyanax mexicanus* con *Danio rerio*, ambos como organismos modelo de investigación, los ovocitos que obtuvimos de nuestras poblaciones de estudio se encontraban en la etapa de maduración, ya que para *Danio rerio* el diámetro de los ovocitos en esta fase es de 412.75 μm y el grosor del corion es de 1.6 μm , mayor al que obtuvimos para *Astyanax mexicanus* que fue de Me=1 μm para todas las poblaciones

estudiadas, además Kimmel *et al.* 1995 en su trabajo “etapas del desarrollo embrionario del pez cebra” menciona que los ovocitos fertilizados de esta especie miden 700 μm , similar a los de nuestras poblaciones que midieron 680 μm en la población de Pachón. En el caso de la población de Caballo Moro, se observaron ovocitos en etapa de crecimiento secundario (237.7 μm) en los que se pudo observar la presencia de vellosidades que ayudan en el transporte de material extracelular, lo cual conduce a la formación de poros o canales que representan las estrías radiales del corion, por lo que se le hace referencia como zona radiata (Guraya 1986; Selman y Wallace 1989). Dentro de esos materiales extracelulares, la vitelogenina es muy importante ya que influye en la circulación de la sangre que se desplaza entre las células endoteliales de los capilares, y posteriormente entre las células foliculares, llegando a la región donde las microvellosidades se extienden a través de los poros de la membrana vitelina (Selman y Wallace 1986; Smythe 2003), para formar el ooplasma o yema que se convertirá en el material del saco vitelino con el cual se alimentará el embrión durante su etapa de desarrollo larvario.

Varios factores contribuyen a prevenir la poliespermia en peces teleósteos (Kobayashi y Yamamoto 1981; Hart 1990). Uno de ellos es el diámetro del canal micropilar, el cual es cercano al tamaño de la cabeza del espermatozoide, en este caso se encontró que el diámetro del micrópilo era igual al diámetro de la cabeza del espermatozoide, por lo que es posible que no exista un canal micropilar, o al menos no fue evidente en nuestras fotografías de MEB, por lo que se sugiere que en futuros trabajos se realicen cortes longitudinales del micrópilo a fin de evaluar la presencia de un canal.

Otro factor que evita la poliespermia es la reacción cortical que ocurre cuando el espermatozoide penetra al ovocito, produciendo cambios morfofuncionales en el corion, en este caso el cambio morfofuncional que se encontró fue la formación del tapón de la membrana externa que recubre al corion en la zona del micrópilo, cambio que no se ha reportado en otras especies de peces teleósteos.

De acuerdo con Yamagami *et al.* (1992), estos cambios morfofuncionales ocurren con o sin fertilización, siendo activados por el contacto con el agua del acuario que hace que el huevo se vuelva turbio y se endurezca el corion. Debido a

que se realizó la extracción de los ovocitos a través del masaje abdominal con el pez anestesiado, se evitó el contacto con el agua y por ello no se encontró este mismo cambio en los ovocitos de todas las poblaciones.

Simón *et al.* 2019 reporta que el número estimado de huevos por desove en *Astyanax mexicanus* en los peces de superficie es de 3,589, número mayor al que obtuvimos con nuestra población de superficie de Bocatoma (950), en el caso de los peces de cueva, reporta 1,442 huevos por desove, número mayor al que obtuvimos con nuestras poblaciones de Escondido (958), Pachón (450), Pichijumo (484), Vázquez (38) y Tigre (6). De igual forma reporta la longitud estándar de las hembras que utiliza, la cual es 7.9 cm para superficie y 7.4 cm para cueva, en este caso la longitud de nuestras hembras de superficie fue de 6.85 cm y de las de cueva fue de 6.2 cm.

Finalmente otra variable que reporta Simón *et al.* 2019 es el número de huevos por cm de hembra, el cual es de 436 para las hembras de superficie y 163 huevos para las de cueva, de igual forma superior a lo que obtuvimos nosotros, 138 huevos para superficie y 72 huevos para las hembras de cueva. Por lo que posiblemente otros factores además de la talla (cm) de la hembra, podrían estar modificando el tamaño de puesta, pero podría ser explorado en futuros estudios.

8. Conclusiones

- Al utilizar un fotoperiodo de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad se puede estimular la maduración gonadal de machos y hembras de las poblaciones troglobias y de superficie de *Astyanax mexicanus*, obteniendo mayor respuesta en la espermatogénesis.
- No se observó un efecto de la temperatura sobre la maduración gonadal de machos y hembras de las poblaciones troglobias y de superficie de *Astyanax mexicanus*.
- Se observó un efecto combinado de temperatura y fotoperiodo, en la maduración gonadal, sin embargo vimos un efecto dependiente del tiempo experimental de estos dos factores.
- Los valores de calidad del agua con los cuales fue posible llevar a cabo la reproducción de *Astyanax mexicanus* fueron: pH 7 ± 0.2 , Nitritos 1.2 ± 1.1 mg/L, Nitratos 11.1 ± 5.5 mg/L, Amonio 1.4 ± 0.6 mg/L, Fosfato 0.7 ± 0.3 mg/L, Conductividad 456.9 ± 8.5 $\mu\text{s/cm}$, salinidad 0.22 ± 0.004 psu y Oxígeno disuelto 36.4 ± 3.5 % DO.
- La prueba de tinción de vitalidad de eosina-nigrosina probó ser una herramienta rápida y económica para conocer la calidad espermática de las poblaciones de *Astyanax mexicanus*, así como un método confiable en la asignación de machos reproductivamente activos..
- El uso de Ovaprim (sGnRHa+Domperidona) es efectivo para inducir el desarrollo ovárico, maduración final de ovocitos y desove en *Astyanax mexicanus* y puede considerarse su uso para llevar a cabo ensayos de hibridación entre morfotipos.
- El mecanismo que evita la poliespermia en *Astyanax mexicanus* es la formación del tapón de la membrana externa del corion en la zona del micrópilo.
- Se encontraron diferencias morfológicas entre los gametos de las poblaciones de cueva y superficie. Los ovocitos en las poblaciones de cueva son más pequeños (600-700 μm) que los de superficie (850-1000 μm) y presentan menor número de poros en el corion (8 por $10\mu^2$), que los de superficie (14 por $10\mu^2$). Además se observó que es más grueso el corion de

los peces de cueva (1.4 μm) que los de superficie (1 μm). En el caso de los espermatozoides, se encontró mayor viabilidad en las poblaciones de superficie (99%) que en los de cueva (<80%), mientras que el área de la cabeza del espermatozoide fue mayor en cueva (7 μm) que en superficie (4 μm). Sin embargo es importante considerar que tuvimos un tamaño muestral mayor en cueva que en superficie (6:1).

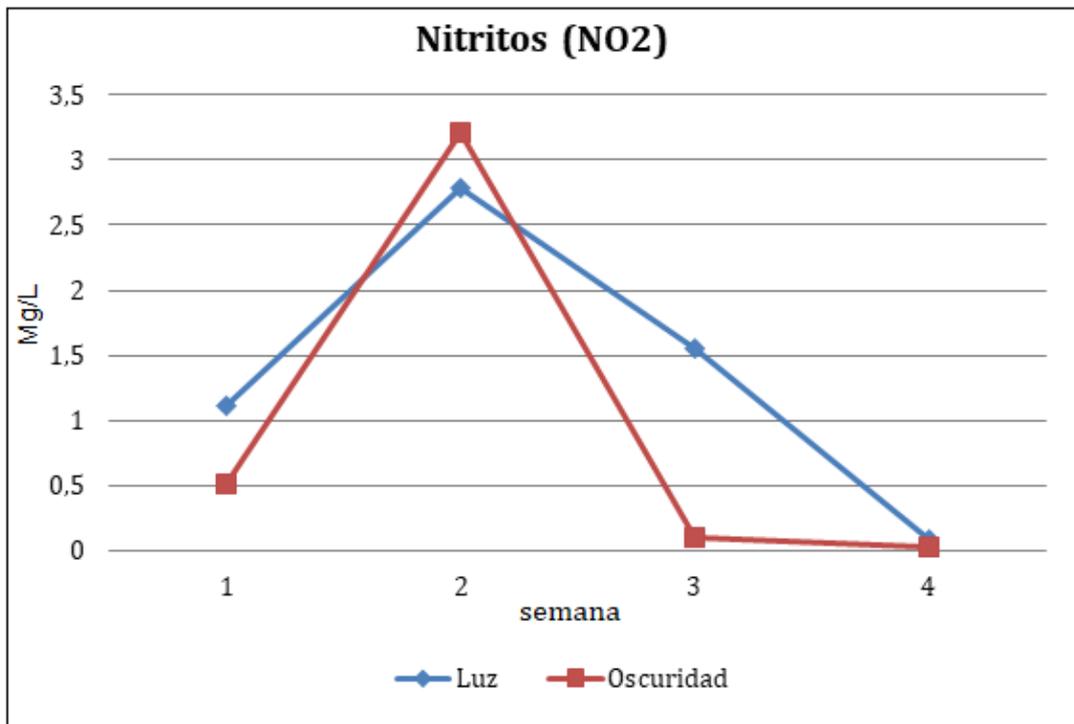
9. ANEXOS.

Anexo 1. Eigenvalor y porcentaje de varianza de cada uno de los componentes principales (CP) y varianza acumulada.

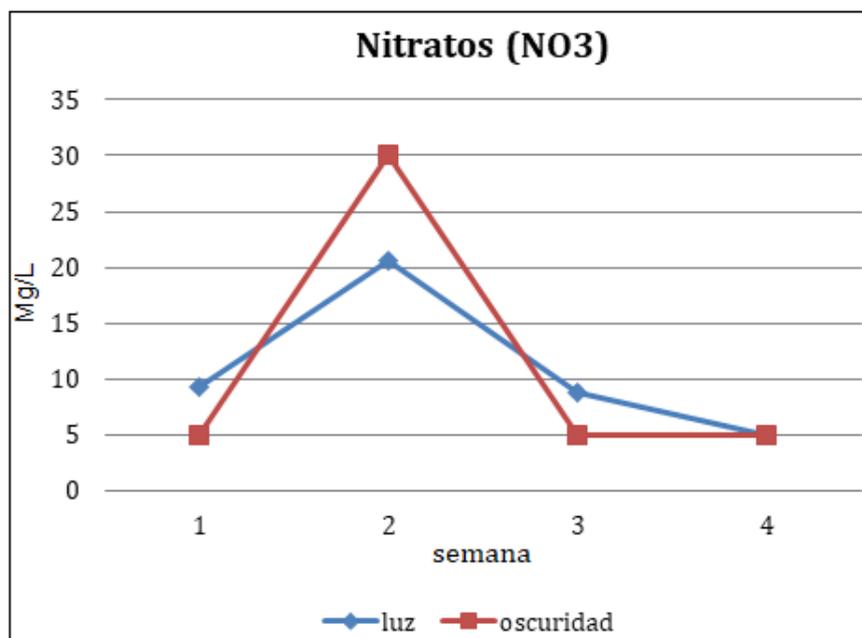
CP	Eigenvalor	% varianza	% varianza acumulada
1	2.75	34.44	34.44
2	1.91	23.85	58.29
3	1.10	13.77	72.06
4	0.68	8.48	80.54
5	0.66	8.24	88.78
6	0.46	5.81	94.59
7	0.30	3.82	98.41
8	0.13	1.60	100

Anexo 2 Porcentaje de varianza de cada componente principal (CP) una vez eliminado el tercer componente, donde se observa que los dos primeros componentes representan el 66.5% de la varianza.

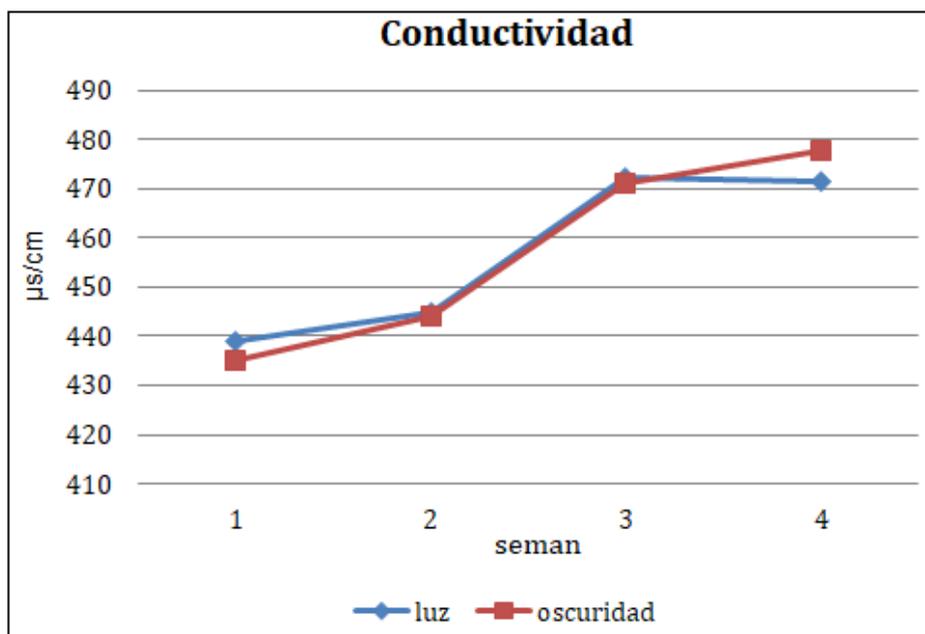
Componente	Eigenvalor	% de la varianza	% acumulado
1	2.748	39.258	39.258
2	1.907	27.243	66.501
3	0.729	10.413	76.914
4	0.662	9.457	86.372
5	0.518	7.404	93.776
6	0.308	4.401	98.177
7	0.128	1.823	100.000

Anexo 3. Medias de los nitritos por semana y fotoperiodo.

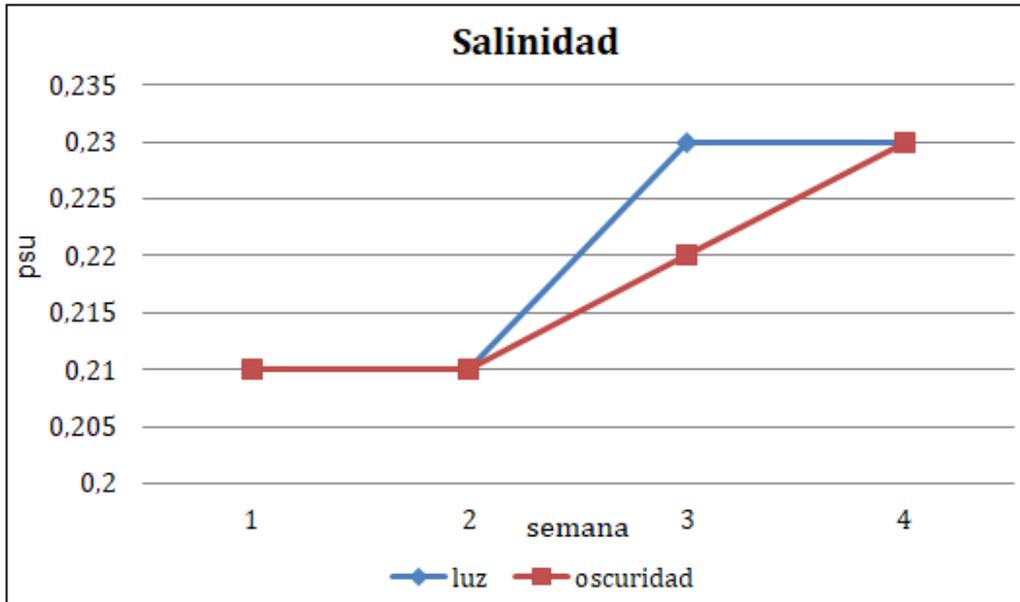
La línea azul representa a las unidades experimentales (UE) mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y la línea roja representa a las UE mantenidas en total oscuridad. Se puede observar que en la semana 2, las UE presentaron mayor número de nitritos (NO₂).

Anexo 4. Medias de los nitratos por semana y fotoperiodo.

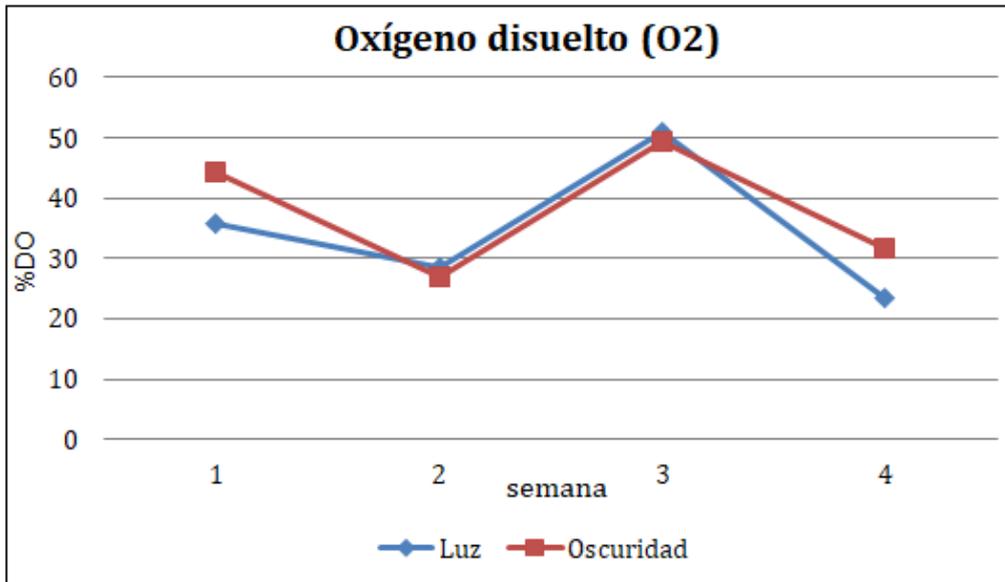
La línea azul representa a las unidades experimentales (UE) mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y la línea roja representa a las UE mantenidas en total oscuridad. Se puede observar que en la semana 2, las UE presentaron mayor número de nitratos (NO₃).

Anexo 5. Medias de la conductividad por semana y fotoperiodo.

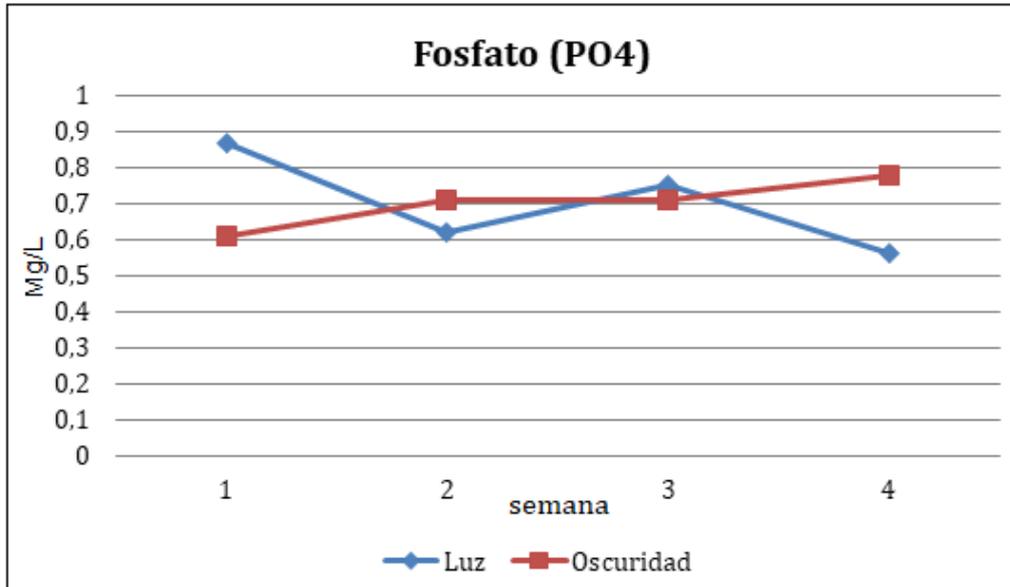
La línea azul representa a las unidades experimentales (UE) mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y la línea roja representa a las UE mantenidas en total oscuridad. Se puede observar que la conductividad va incrementando conforme pasa el tiempo, llegando a obtener su valor máximo en la semana 4.

Anexo 6. Medias de la salinidad por semana y fotoperiodo.

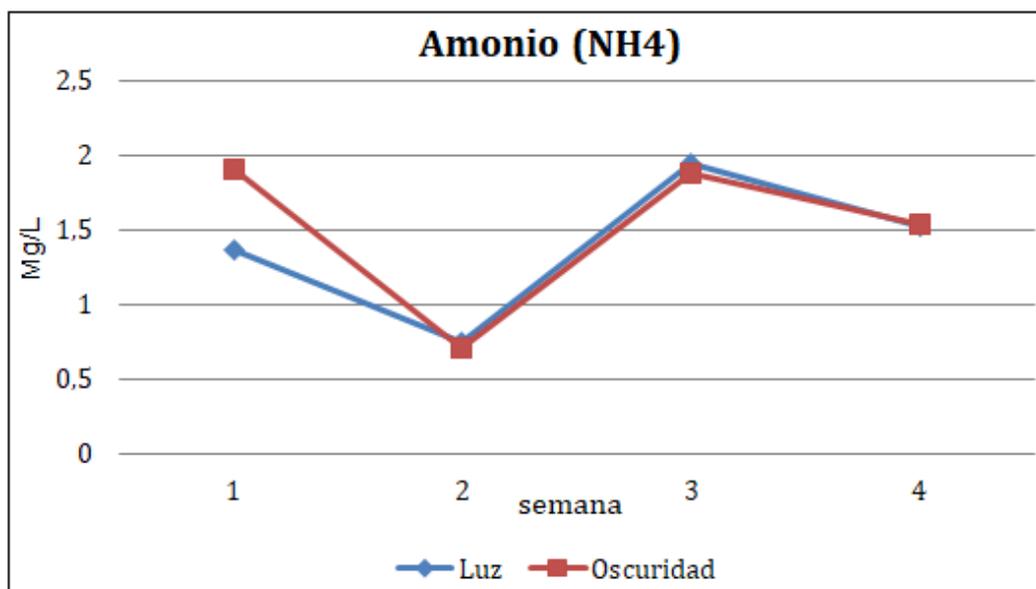
La línea azul representa a las unidades experimentales (UE) mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y la línea roja representa a las UE mantenidas en total oscuridad. Se puede observar que la salinidad va incrementando conforme pasa el tiempo, llegando a obtener su valor máximo en la semana 4.

Anexo 7. Medias del porcentaje de oxígeno disuelto por semana y fotoperiodo.

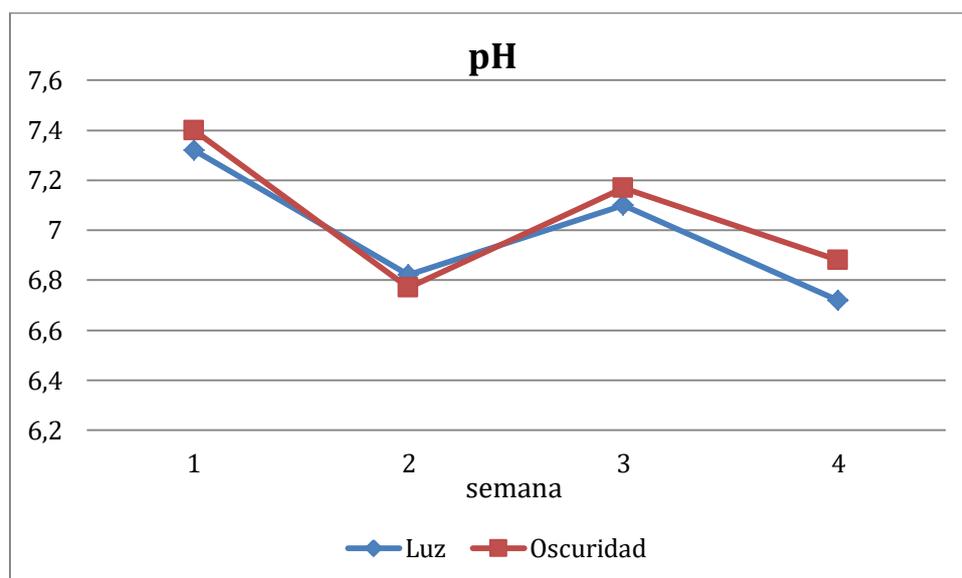
La línea azul representa a las unidades experimentales (UE) mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y la línea roja representa a las UE mantenidas en total oscuridad. El comportamiento de la variable fue muy similar en ambas condiciones de fotoperiodo, obteniendo en la semana 3 el mayor porcentaje de oxígeno disuelto.

Anexo 8. Medias del fosfato por semana y fotoperiodo.

La línea azul representa a las unidades experimentales (UE) mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y la línea roja representa a las UE mantenidas en total oscuridad. Para las UE mantenidas con el fotoperiodo de total oscuridad, el fosfato fue incrementando conforme pasaron las semanas, y para las UE mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad, el fosfato tuvo decrementos e incrementos en cada semana.

Anexo 9. Medias del amonio por semana y fotoperiodo.

La línea azul representa a las unidades experimentales (UE) mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y la línea roja representa a las UE mantenidas en total oscuridad. El comportamiento de esta variable fue muy similar en ambas condiciones de fotoperiodo, alcanzando su valor máximo en la semana tres.

Anexo 10. Medias del pH por semana y fotoperiodo.

La línea azul representa a las unidades experimentales (UE) mantenidas con el fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y la línea roja representa a las UE mantenidas en total oscuridad. El comportamiento de esta variable fue muy similar en ambas condiciones de fotoperiodo, alcanzando su valor máximo en la primera semana.

Anexo 11. Porcentaje de machos que se encontraron reproductivos en cada semana de tratamiento térmico.

Semana	No reproductivos	Reproductivos	Total
1	16	10	26
2	23	3	26
3	22	4	26
4	10	16	26
Total	71	33	104

Anexo 12. Medias marginales estimadas del porcentaje de machos activos reproductivamente de acuerdo al Fotoperiodo.

Fotoperiodo	Media	Error estándar	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
.0	.18	.058	.09	.32
12.0	.38	.077	.25	.54

(χ^2 de Wald(1)=4.4, p=0.035)

10. Referencias

1. Allen G. Strickler, Yamamoto, Y., Jeffery WR. (2001). Early and late changes in Pax6 expression accompany eye degeneration during cavefish development. *Development Genes and Evolution*, (211), pp.138–144.
2. Álvarez B., Arenal A., Fuentes R., Pimentel R., Abad Z. and Pimentel E. (2009). Use of post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa to increase hatchery productions In E. Cabrita., V. Robles & P. Herraes (Eds.). *Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Florida, EE. UU.: C. R. C. Press. (pp. 345-350).
3. Arantes FP., Santos HB., Rizzo E., Sato Y., Bazzoli N. (2010). Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Animal Reproduction Science*, (118), pp. 330-336.
4. Beale A., Guibal C., Tamai T.K., Klotz L., Cowen S., Peyric E., Reynoso V.H., Yamamoto Y., Whitmore D. (2013). Circadian rhythms in Mexican blind cavefish *Astyanax mexicanus* in the lab and in the field. *Nature Communications*, 4:2769).
5. Bibliowicz, J., Alié, A., Espinasa, L., Yoshizawa, M., Blin, M., Hinaux, H., Laurent Legendre, L., Père, S., Rétaux, S., (2013). Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Río Subterráneo cave. *EvoDevo* 4 (1), pp. 25
6. Billard, R. (1986). The reproductive cycle of the male and female brown trout (*Salmo trutta fario*); a quantitative study. *Reproduction Nutrition Development*, (27), pp. 29-44.
7. BjoÈrndahl L.,Ola B., Afnan M., Papaioannou S., Sharif K. and Coomarasamy A. (2003). Accuracy of sperm cervical mucus penetration tests in evaluating sperm motility in semen: a systematic quantitative review. *Human Reproduction*, 18 (5) pp. 1037-1046.
8. Borowsky, R. (2008a). Breeding *Astyanax mexicanus* through natural spawning. *Cold Spring Harb. Protoc*, 3 (12) pp. 1071-1073.

9. Borowsky, R. (2008b). In vitro fertilization of *Astyanax mexicanus*. *Cold Spring Harb. Protoc*, 3 (12) pp. 1-3.
10. Borowsky, R., (2013). Eye regression in blind *Astyanax* cavefish may facilitate the evolution of an adaptive behavior and its sensory receptors. *BMC Biol.* (11), 81.
11. Boudriot F., Reutter K. (2001). Ultrastructure of the taste buds in the blind cave fish *Astyanax jordani* ("Anoptichthys") and the sighted river fish *Astyanax mexicanus* (Teleostei, Characidae) *J. Comp. Neurol.*, (434), pp. 428-444.
12. Brambila-Souza G., C.C.Mylonas, P.H.Mello, R.Y.Kuradomi, S.R.Batlouni, C.E.Tolussi, R.G.Moreira. (2019). Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. *General and Comparative Endocrinology*, (279), pp. 120-128.
13. Breder, C. M., JR. (1942). Descriptive ecology of La Cueva Chica, with especial reference to the blind fish, *Anoptichthys*. *Zoológica*, (27). pp. 7-15.
14. Cahn, P. H. (1958). Comparative optic development in *Astyanax mexicanus* and in two of its blind cave derivatives. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, (115), pp. 75- 112.
15. Cárdenas R., Chávez M., González J.L., Aley P., Espinoza J., García L.F. (2008). Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silverside fish *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Rev. Biol. Trop.*, 56 (4), pp.1825-1835.
16. Chalah, T. y Brillard. J.P. (1998). Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology*, 50 (3), pp.487–93.
17. DE VLAMING, V. L. (1972). Environmental control of teleost reproductive cycles: a brief review. *J. Fish Biol.* (4), pp.131-140.
18. Donaldson EM, GA Hunter. (1983). Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds). *Fish Physiology. Reproduction*. Vol. 9B. Academic Press, Orlando, USA, Pp 351-403.

19. Donaldson EM, RH Devlin, F Piferrer, I Solar. (1996). Hormones and sex control in fish with particular emphasis on salmon. *Asian Fisheries Science* (9), pp. 1-8.
20. Donaldson EM. (1997). The role of biotechnology in sustainable aquaculture. In: Bardach JE (ed). Sustainable aquaculture. John Wiley and Sons Inc., New York, USA, Pp 101-126.
21. Duboué, E.R., Keene, A.C., & Borowsky, R. L. (2011). Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Current Biology*, 21(8), pp. 671-676.
22. Ekcstein B. (1975). Possible reasons for the infertility of grey mullets confined to fresh water. *Aquaculture* (5), pp. 9-17.
23. Elliott R. W. (2016). Chapter 1 "Cave Exploration and Mapping in the Sierra de El Abra Region". In Alex C. Keene, Masato Yoshizawa and Suzanne E. McGaugh (eds). *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Jefferson City, Missouri, USA, pp. 9-40
24. Espinasa, L., Yamamoto, Y., Jeffery, W.R., (2005). Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behav. Process.*, (70), pp.144–148.
25. Estay FJ, AM Ronco, L.G. Cáceres. (1996). Respuesta ovulatoria y niveles séricos de GtH II alcanzados en hembras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inducidas a ovular con GnRH α D-Ala6. *Arch Med Vet.* (38), pp. 73-78.
26. Estrada J.A., Maldonado M., García L.V., Carrillo M., Rebollar R., Spanopoulos M. (2014). Efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la composición bioquímica en reproductores silvestres de cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(1): pp. 85-96.
27. Falcón J., Besseau L., Fuentes M., Sauzet S., Magnanou E. & Boeuf G. (2009). Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163(1), pp. 101-111.
28. Fribourgh, J. H. (1966). The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldsh spermatozoa. *The Prog. Fish-Culturist*, 28(4), pp.227-231.

29. Garner D., D. Pinkel, L. Johnson y M. Pace. (1987). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, (34), pp. 127-138.
30. Garner D. y L. Johnson. (1995). Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction*, (53), pp. 276-284.
31. Grunewald-Lowenstein M. (1956). Influence of light and darkness on the pineal body in *Astyanax mexicanus* (Filippi), *Zoologica* (41), pp.119-128.
32. Guraya, S.S. (1986). Recent advances in the morphology, cytochemistry and function of Balbiani's vitellines body in animal oocytes. *Int. Rev. Cytol.* (59), pp. 249-321.
33. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
34. Hart, N. H. (1990). Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *International Review of Cytology* (121), pp. 1–66.
35. Harvey BJ, WS Hoar. (1980). Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Centro Internacional para el Desarrollo, Ottawa, Canadá.
36. Herman A, Brandvain Y, Weagley J, Jeffery WR, Keene AC, Kono TJY, (2018). The role of gene flow in rapid and repeated evolution of cave-related traits in Mexican tetra, *Astyanax mexicanus*. *Molecular ecology* 27(22), pp.4397–416.
37. Hoar W. (1969). Reproduction. In: Hoar WS, Randall DJ (eds). *Fish Physiology*. Vol. III. Academic Press Inc, USA, Pp 1-59.
38. Hoga, C.A, Almeida, F.L., and Reyes, F.G.R. (2018). A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), pp. 679-691.
39. IBM Corp. Released (2011) IBM SPSS Statistics for Windows. Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

40. Jamróz M., Kucharczyk D., Hakuc-Btazowska A., Krejszeff S., Kujawa R., Kupren K., Kwiatkowski M., Targońska K., Zarski D., Cejko B., Glogowski J.(2008). Comparing the effectiveness of Ovopel, Ovaprim and LH-RH analogue used in the controlled reproduction of ide, *Leuciscus Idus* (L.). *Archives of Polish Fisheries*, 16(4), pp. 363-370.
41. Joshua B. Gross, Allison Furterer, Brian M. Carlson, Bethany A. Stahl (2013). An Integrated Transcriptome-Wide Analysis of Cave and Surface Dwelling *Astyanax mexicanus*. *Plos One*, 8(2) e55659.
42. Kaviani E.F, Shabanipour N. and Mirnategh S.B. (2013). Light and electron microscope structural study of the zona radiata in the oocyte of zebrafish (*Danio rerio*). *Microscopy* 62(3), pp. 377–382
43. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullman, B. & Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), pp. 253-310.
44. Klimowicz-Bodys M.D., F. Batkowskic, A.S. Ochremd y M.A. Savic. (2012). Comparison of assessment of pigeon sperm viability by contrast phase microscope (eosin-nigrosin staining) and flow cytometry (SYBR-14/ propidium iodide (PI) staining). *Theriogenology*, (77), pp. 628–635
45. Kobayashi W., Yamamoto T. S., (1981).Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *J. exp. Zool.*, (217), pp. 265-275.
46. Krejszeff S., Kucharczyk D., Kupren K., Targońska K., Mamcarz A., Kujawa R., Kaczkowki Z., Ratajski S. (2008).Reproduction of chub, *Leuciscus cephalus* L., under controlled conditions. *Aquacult.Res.*, (39), pp. 907-912.
47. Kucharczyk D. (2002). Controlled reproduction and androgenesis of chosen species of cyprinid fish; *Rozprawy monografie* 63, Wyd. UWM, Olsztyn, p. 81 (in Polish).
48. Karl Z., Bernhard T., and Roll B. (1983). The development of the eye in *Astyanax mexicanus* (Characidae, Pisces), its blind cave derivative, *Anoptichthys jordani*

(Characidae, Pisces), and their crossbreds. *Cell Tissue Research* (229), pp.423-432.

49. Lam, T.J. (1983) Environmental influences on gonadal activity in fish. In Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M., eds. *Fish Physiology*, Vol. 9B. New York: Academic Press, pp. 65-116.

50. Lee CS, CS Tamaru. (1988). Advances and future prospects of controlled maturation and spawning of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) in captivity. *Aquaculture*, (74), pp.63-73.

51. McCullagh P, Nelder JA. (1989). Binary data. In: *Generalized Linear Models*. 2nd ed. London, England: Chapman and Hall; 124 –128.

52. Masato Y., Yamamoto Y, O'Quin KE, Jeffery WR (2012). Evolution of an adaptive behavior and its sensory receptors promotes eye regression in blind cavefish. *BMC Biology*, (10), p. 108.

53. Menuet A., Alunni A., Joly J.S., Jeffery W.R., Rétaux S.(2007). Expanded expression of sonic hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development*, (134), pp. 845–855.

54. Mitchell R.W., Russell W.H., Elliott W.R. (1977). Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: environment, distribution, and evolution. *Special Publ. Mus., Texas Tech. Univ.*, (12), pp. 1–89.

55. Montes Montes Melissa. (2012). *Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en Criopreservación de espermatozoides de Lengado *Paralichthys Adspersus* (Steindachner, 1867)*. Tesis para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga, disponible en: https://www.academia.edu/21842259/UNIVERSIDAD_NACIONAL_MAYOR_DE_SAN_MARCOS_Evaluación_de_la_calidad_espermática_y_ensayos_preliminares_en_Criopreservación_de_espermatozoides_de_Lengado_Paralichthys_Adspersus_Steindachner_1867_TESIS_Para_optar_al_Título_Profesional_de. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, E.A.P. de Genética y Biotecnología, Lima – Perú.

56. Ornelas-García, C.P., Domínguez-Domínguez, O., Doadrio, I., (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii,

Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evol. Biol.*, (8), pp. 340.

57. Palacios E., Rosales Y., Rabinovich G. (2015). Efecto del fotoperiodo y temperatura sobre la maduración y reproducción de *Cynoscion phoxocephalus* ("Ccorvina-Ccherela") en la zona norte del Perú. *Revista de Investigación Científica Universidad Nacional de Tumbes, Perú*, 12(2), pp. 3-10.

58. Patiño R. (1997). Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *The Progressive Fish-Culturist*, (59), pp. 118-128.

59. Patiño R., Yoshizaki G., Peter T., Kagawa H. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, (Part B 129), pp. 427-439.

60. Peter RE, HR Lin, G Van der Kraak. (1988). Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, (74), pp. 1-10.

61. Peter RE, HR Lin, G Van der Kraak, M Little. (1993). Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. In: Muir JF, Roberts RJ (eds). *Recent Advances in Aquaculture*. Blackwell Scientific, Oxford, UK, Pp 25-30.

62. Peter RE, KL Yu. (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev Fish Biol Fisher*, (7), pp. 173-197.

63. Protas M.E., Hersey C., Kochanek D., Zhou Y., Wilkens H., Jeffery W.R., Zon L.I., Borowsky R., Tabin C.J. (2006). Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat. Genet.*, (38), pp. 107–111.

64. Protas M., Jeffery W.R. (2012). Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *WIREs Dev. Biol.* (6), pp. 823-845.

65. Rasband WS. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/, 1997–2012.

66. Redding JM, R Patiño. (1993). Reproductive physiology. In: Evans DH (ed). *The physiology of fishes*. CRC Press, USA, Pp 503-534

67. Rétaux S., Hinaux H., Pottin K., Chalhoub H., Pére S., Elipot Y., Legendre L. (2011). A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish. *Zebrafish*, 8(4), pp. 155-165.
68. Rétaux, S., Casane, D. (2013). Evolution of eye development in the darkness of caves: adaptation, drift, or both? *EvoDevo* (4), pp. 26.
69. Robert P., Zakibe Z., Krishnan J., Merryman M.S., Baumann D.P. & Rohner N. (2019). Gamete collection and In Vitro fertilization of *Astyanax mexicanus*. *Journal of Visualized Experiments*, (147).
70. Rodríguez-Gutiérrez, M. (1992). Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica de peces. México: A. G. T. Editor
71. Rowland, SJ, (1988). Hormone-induced spawning of the Australian freshwater fish Murray cod, *Maccullochella peelii* (Mitchell)(Percichthyidae). *Aquaculture*, (70), pp. 371-389.
72. Rurangwa E, Kime D.E, Olivier F. y Nash J.P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultures fish. *Aquaculture*, (234), pp. 1-28.
73. Sadoglu P. (1979). A Breeding Method for Blind *Astyanax mexicanus* Based on Annual Spawning Patterns. *Copeia*, (2), pp. 369-37.
74. Schemmel, C. (1967). Comparative studies of the cutaneous sense organs in epigeal and hypogean forms of *astyanax* with regard to the evolution of cavernicoles. *Z. Morph. Tiere*, (61), pp. 255–316.
75. Schemmel, C., (1974). Studies on the genetics of feeding behaviour in the cave fish *Astyanax mexicanus* f. *anoptichthys*. *Z. Tierpsychol.* (53), pp. 9–22.
76. Selman, K. and Wallace, R.A. (1986). Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. III. Vitellogenesis. *J exp. Zool*, (226), pp. 441-57.
77. Selman, K. and Wallace, R.A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.*, (6), pp. 221-31.
78. Simon V, Hyacinthe C, Rétaux S (2019). Breeding behavior in the blind Mexican cavefish and its river-dwelling conspecific. *PLoS ONE* 14(2): e0212591.

79. Sih A., Bell A. and Chadwick J.J. (2004). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *TRENDS in Ecology and Evolution.*, 19(7), pp. 372-378.
80. Smythe, E. (2003). Clathrin-coated vesicle formation: a paradigm for coated-vesicle formation. *Biochem. Soc. Trans.*, (31), pp. 736-739.
81. Solar I. (2002). Biotecnología aplicada a la acuicultura. *Aquanoticias Internacional*, (66), pp. 6-10.
82. Sower SA, Schreck B., Donaldson EM.. (1982). Hormone induced ovulation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) held in sea water and fresh water. *Can J Fish Aquat Sci*, (39), pp. 627-632.
83. Stacey N.E. (1984). Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. In: Potts, G.W. Wootton, R.J. (Eds.), *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. Academic Press, London, pp. 207 - 222.
84. Szabó T., Medgyasszay C., Horváth L. (2002). Ovulation induction in nase (*Chondrostoma nasus*, Cyprinidae) using pituitary extractor GnRH analogue combined with domperidone. *Aquaculture*, (203), pp. 389-395.
85. Teyke, T., (1990). Morphological differences in neuromasts of the blind cave fish *Astyanax hubbsi* and the sighted river fish *Astyanax mexicanus*. *Brain Behav. Evol.*, (35), pp. 23–30.
86. Tomarev SI (1997). Pax-6, Eyes absent, and Prox 1 in eye development. *Int J Dev Biol.*, (41), pp. 835–842.
87. Van Winkoop A, LPM Timmermans, HJ Goos. (1994). Stimulation of gonadal and germ cell development in larval and juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) by homologous pituitary extract. *Fish Physiology and Biochemistry*, (13), pp. 161-171.
88. Varatharasan, N., (2009). Taste bud development and patterning in sighted and blind morphs of *Astyanax mexicanus*. *Dev. Dyn.*, (238), pp. 3056–3064.
89. Wilkens H. (1971). Genetic Interpretation of Regressive Evolutionary Processes: Studies on Hybrid Eyes of Two *Astyanax* Cave Populations (Characidae, Pisces) *Evolution*, 25(3), pp. 530-544

90. Wilkens, H., (1988). Evolution and genetics of epigean and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces)—support for the neutral mutation theory. In: Hecht, M.K., Wallace, B. (Eds.), *Evolutionary Biology*. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 271–367.
91. Wilson E.V., Thomas R.Q., Evans L.M. (2004). *Macrobrachium* as a possible determinant of *Astyanax fasciatus* distribution in a neotropical lowland stream. *Dartmouth Stud. Trop. Ecol.* Pp. 99–102.
92. Yamagami K., Hamazaki T. S., Yasumasu S., Masuda K., Iuchi I., (1992). Molecular and cellular basis of formation, hardening and breakdown of the egg envelope in fish. *Int. Rev. Cytol.*, (136), pp. 51-92.
93. Yoshizawa M., Jeffery W.R. (2008). Shadow response in the blind cavefish *Astyanax* reveals conservation of a functional pineal eye. *J. Exp. Biol.* (211), pp. 292-299.
94. Yoshizawa M., Gorički Š., Soares D., Jeffery, W.R. (2010). Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cave fish find food in darkness. *Curr. Biol.* (20), pp.1631– 1636.
95. Zachmann A., Falcon J., Knijff S.C.M., Bolliet V., Ali M.A. (1992). Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* (86), pp. 26–33.
96. Zanuy S, F Prat, M Carrillo, N Bromage. (1995). Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17β -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat Living Resour*, (8), pp. 147-152
97. Zanuy S. y Carrillo M. (1987). La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. In: Espinosa de los Monteros J., Labarta U. (eds). *Reproducción en acuicultura*. España: CAYCIT. pp. 1-81.
98. Zeitlin S. M. (1973). Hormonal induction of ovulation and spawning in the blind cave fish, *Anoptichthys jordani* with the use of human chorionic gonadotropin. *Experientia* (20), pp.461-462.

99. Zohar Y. (1988). Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations. *Reproduction in fish: basic and applied aspects in endocrinology and genetics*. Tel-Aviv, Israel, 10-12 November 1986. Ed. INRA, Paris 1988. *Les Colloques de l'INRA* 4, 47-60.
100. Zohar Y. (1995). New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bull Natl Res Inst Aquacult*, (2), pp. 43-48
101. Zohar, Y. & Mylonas, C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* (197), pp. 99-136.