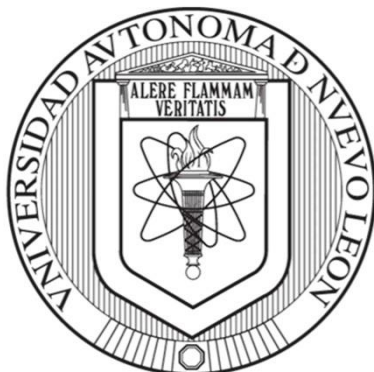


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IDENTIFICACIÓN SEXUAL E INDUCCIÓN A LA REPRODUCCIÓN MEDIANTE
EL USO DE HORMONAS EN EL CATÁN PINTO
Lepisosteus oculatus (WINCHELL, 1894)

Por

Biól. EFRAÍN ASAF ARMIJO MARTÍNEZ

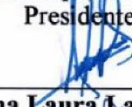
Para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CONSERVACIÓN, FAUNA SILVESTRE Y SUSTENTABILIDAD.

2025

**IDENTIFICACIÓN SEXUAL E INDUCCIÓN A LA
REPRODUCCIÓN MEDIANTE EL USO DE
HORMONAS EN EL CATÁN PINTO,
Lepisosteus oculatus (Winchell, 1894)**

Comité de Tesis


Dra. Flor Guadalupe Sánchez Alejandro
Presidente


Dra. Ana Laura Lara Rivera
Secretario


Dra. Susana Favela Lara
Vocal 1


Dr. Alejandro Ledezma Villanueva
Vocal 2


Dr. Jesús Ángel de León González
Vocal 3

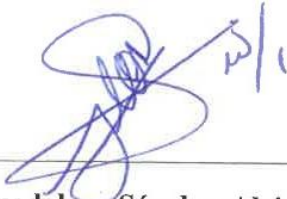

Dra. Katushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

**IDENTIFICACIÓN SEXUAL E INDUCCIÓN A LA
REPRODUCCIÓN MEDIANTE EL USO DE
HORMONAS EN EL CATÁN PINTO,
Lepisosteus oculatus (Winchell, 1894)**

Dirección de Tesis



Dra. Flor Guadalupe Sánchez Alejandro

Directora



Dr. Sergio Alberto Luna Peña

Director Externo

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo económico brindado por la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI).

A mí comité de tesis por formar parte de este proyecto, a mí asesora la Dra. Flor Sánchez Alejandro por aceptar dirigirme en este proyecto y apoyarme en mi formación desde la licenciatura.

Agradecer especialmente al Dr. Roberto Mendoza por permitirme formar parte de su laboratorio y cuyas aportaciones fueron esenciales para la realización de este trabajo. Gracias por tantos conocimientos compartidos y ser un ejemplo del actuar de un profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Grupo Ecofisiología del cual formé parte por los últimos 4 años de mi formación académica.

De igual forma al laboratorio de Virología del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero y a Perla por apoyarme en la realización del ELISA.

Al laboratorio de Histología del Dr. José Gerardo Ham Dueñas y sus integrantes; Omar, Karyme, Francisco, Hanya, Frida y todos los que me apoyaron en la realización de los cortes y la tinción.

A mis compañeros de generación: Adrián, Ibarra, Lía, Nora. Omar, Jorge, Vargas disfruté mucho de este proceso junto con ellos, hicieron más sencillo todo este proceso.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres Alejandro Armijo y Rosy Martínez, sin ellos todo esto no hubiera sido posible.

A Thania Cruz me impulsaste a llegar hasta acá, he aprendido mucho contigo.

Finalmente dedico este trabajo a mis gatos, Wero y Peludita, siempre puedo contar con su compañía y están para mí siempre.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	xiii
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Diversidad, características distintivas y distribución de Lepisosteidae	3
2.2 Factores ambientales en la reproducción.....	4
2.3 Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal	4
2.4 Vitelogénesis	5
2.5 Dimorfismo sexual y técnicas de identificación sexual	7
2.6 Aspectos reproductivos en Lepisosteidos	8
2.7 Inducción hormonal en <i>L. oculatus</i>	9
2.8 Desarrollo embrionario y larvario en Lepisosteidos.....	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5.1 Objetivo General.....	14
5.2 Objetivos Particulares	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Material biológico	15
6.2. Precipitación selectiva de VTG plasmática	16
6.3 Cuantificación indirecta de vitelogenina mediante fosfoproteína alcalina lábil	16
6.4 ELISA	16
6.5 Inducción al Desove	17
6.6 Sexado directo y procesamiento histológico	18
6.7 Medidas morfométricas	21
6.9 Análisis Estadístico	23
7. Resultados.....	24
7.1 Mantenimiento de Individuos Experimentales.....	24
7.2 Dimorfismo sexual	25
7.3 Cuantificación indirecta de VTG mediante el método ALP	33
7.4 ELISA indirecto	34

7.5 Sexado directo	36
7.6 Índice Gonadosomático	39
7.6 Histología	40
8. DICUSIÓN.....	43
8.1 Mantenimiento de los organismos	43
8.2 Precipitación de la VTG	43
8.3 ELISA	43
8.3 Dimorfismo sexual	45
8.4 Cuantificación indirecta de VTG mediante el método ALP	47
8.5 Sexado directo	47
8.6 Índice Gondasomático	48
8.7 Caracterización Histológica	49
8.8 Respuesta a la inducción	50
9. CONCLUSIONES.....	51
10. PERSPECTIVAS	52
11. BIBLIOGRAFÍA.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolos de inducción en el catán pinto (<i>Lepisosteus oculatus</i>) implementando distintas hormonas, dosis y vías de administración.	9
Tabla 2. Se muestran los tratamientos, la vía de inducción y la dosis.	17
Tabla 3. Pasos de deshidratación, aclarado y preinclusión junto con los reactivos y la temperatura para el procesamiento histológico.	19
Tabla 4. Se muestran los pasos de la tinción de Hematoxilina y Eosina.	20
Tabla 5. Se muestran las siglas y el nombre de las variables medidas en cada organismo (n=14).	22
Tabla 6. Medias y desviación estándar por cada variable medida y sexo, además del valor intercuartílico. Todo en milímetros.	25
Tabla 7. Se muestran los valores de magnitud por variable entre las interacciones. Se resaltan las variables con mayor magnitud.	30
Tabla 8. Predicción obtenida por cada individuo mediante el Análisis Discriminante Lineal. Se muestran las probabilidades de identificar entre hembra y macho.	31
Tabla 9. Probabilidades a priori de pertenecer a un grupo (macho o hembra) predichas con el análisis discriminante lineal.	31
Tabla 10. Concentración de fosfatos para cada muestra de los organismos procesados por el método de ALP. Se muestra la desviación estándar.	33
Tabla 11. Peso total de ambas gónadas (g), peso de individuo (g) e índice gonadosomático (GSI) por cada individuo y sexo.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del eje hipotálamo hipófisis gonadal. Adaptado de Mañanós et al., (2008).....	5
Figura 2. Esquema general de la vitelogénesis. Modificado de Hara et al., 2016.	6
Figura 3. Cuerpos esféricos rodeados de membrana, mediados por V-ATPasa con los componentes de la VTG. Modificado de Sullivan y Yilmaz (2018).....	7
Figura 4. Obtención de la muestra de plasma por punción de la vena caudal con aguja y vacutainer.....	15
Figura 5. Aplicación de las inyecciones en la base de la aleta pélvica.	18
Figura 6. Medidas del cuerpo que se emplearon para el sexado.	21
Figura 7. Medidas de la cabeza consideradas para el sexado. Cráneo de <i>L. oculatus</i> tomado de Grande (2010).	21
Figura 8. Ejemplificación de las fotografías para la medición.	22
Figura 9. Individuos experimentales en el estanque de reproductores de concreto.	24
Figura 10. Pareja de individuos después de la inducción. Se observa el enriquecimiento ambiental.....	24
Figura 11. Coordenadas de los individuos con las respectivas interacciones. A) CP1 vs CP2, B) CP1 vs CP3, C) CP2 vs CP3, en el diagrama de dispersión bidimensional.....	26
Figura 12. Correlaciones entre CP1vsCP2 (a), Correlación entre CP1vsCP3 (b) y correlación entre CP2vsCP3 (c). Se resaltan en rojo las medidas que mejor explican la variabilidad del eje y, mientras que en azul se resaltan las medidas que mejor explican la variabilidad en el eje x.	27
Figura 13. Boxplot donde se muestran la altura de la aleta anal (AFH) en milímetros entre machos y hembras. Es posible observar dos hembras con datos atípicos, una en el límite inferior y otra en el superior. Por el contrario, ambos machos se encuentran en el límite inferior.....	28
Figura 14. Boxplot donde se muestran la longitud de la base de la aleta anal (ABL) en milímetros entre machos y hembras. Es posible observar una hembra con un dato atípico y dos machos.	28
Figura 15. Boxplot donde se muestran la longitud del hocico (SNL) en milímetros entre machos y hembras.	28
Figura 16. Boxplot donde se muestran el diámetro orbital (ORD) en milímetros entre machos y hembras.....	29
Figura 17 Boxplot donde se muestran la altura de la cabeza a nivel de la órbita (HHO) en milímetros entre machos y hembras.....	29
Figura 18. Distribución de pesos en gramos por sexo de los individuos.	29
Figura 19. Gráfico de dispersión del Análisis Discriminante Lineal. Se muestra la separación entre hembras (5) y machos (9).....	32
Figura 20 Curva estándar de fosfatos para el método ALP empleando como stock tres reactivos distintos. Se observan la desviación estándar para cada punto.	33
Figura 21. ELISA con muestras de plasma, se muestra la absorbancia y la desviación estándar. I2=Macho de catán inducido, I2= Macho de catán inducido sin precipitar, Ch=Hembra de catán, Chsp=Hembra de catán sin precipitar, Pjm=Pejelagarto macho, Pjh=Pejelagarto hembra, Gm=Goldfish macho, Gh=Goldfish hembra. Individuos 2, 7 y 12 son los individuos experimentales. T2, T4, T8 y T16 son diluciones de plasma de hembra de catán.....	34

Figura 22. Concentración relativa de VTG a partir de la titulación de muestras de plasma de hembra de catán confirmada, por grupo <i>A. tropicus</i> , <i>A. spatula</i> , <i>L. ocellatus</i> previo a la inducción y posterior.	35
Figura 23. División de sexo por cluster a partir de las lecturas de los individuos. El cluster 0 representa a las hembras y el 1 a los machos.	36
Figura 24. Individuo ID-1. Identificado como hembra.	37
Figura 25. Individuo ID-3. Identificado como macho.	37
Figura 26. Individuo ID-5. Identificado como macho.	37
Figura 27. Individuo ID-13. Identificado como macho.	38
Figura 28. Individuo ID-14. Identificado como macho.	38
Figura 29. Individuo ID-V1. Identificado como macho.	38
Figura 30. Individuo ID V-2. Identificado como macho.	39
Figura 31. Boxplot donde se muestra la distribución del GSI de los machos con referencia a la única hembra identificada resaltado en rojo.	40
Figura 32. Lumen central en la muestra de hembra. Tinción HyE.	41
Figura 33. Epitelio discontinuo y presencia de espermatogonias en muestra de un macho. Tinción HyE.	42

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

17 β -estradiol:	(E2)
Análisis de Componente Principales:	(PCA)
Análisis Discriminante Lineal:	(LDA)
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay:	(ELISA)
Ala6-LHRHa:	(Análogo superactivo)
Esteroides inductores de maduración:.....	(MIS)
Fosfoproteína alcalina lábil:.....	(ALP)
Hormona folículo estimulante:	(FSH)
Hormona liberadora de gonadotropinas:	(GnRH)
Hormona luteinizante:	(LH)
Retículo endoplasmático rugoso:	(RER)
Testosterona:	(T)
Vitelogenina:	(VTG)

RESUMEN

El catán pinto (*Lepisosteus oculatus*) es una especie nativa para el Noreste de México, categorizado como Amenazada en la NOM-059 SEMARNAT-2010, debido a la pérdida de su hábitat y la sobreexplotación de los cuerpos de agua. En este contexto, la reproducción *ex situ* destaca como una herramienta indispensable para su conservación. En los Lepisoteidos resulta necesario mantener una proporción sexual adecuada para lograr desoves exitosos; por ello, se debe identificar el sexo de los individuos. Sin embargo, este grupo presenta condición gimnoaria o condriectina, lo que dificulta emplear métodos de identificación sexual tradicionales, además de carecer de dimorfismo sexual aparente. De aquí, que se plantee el uso de técnicas de identificación sexual indirectas a partir de la vitelogenina plasmática y en mucus. Esta molécula fue precipitada para posteriormente detectar su presencia mediante ELISA indirecto con anticuerpos anti-VTG de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Asimismo, se midieron variables morfométricas para explorar un posible dimorfismo sexual a través de análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante lineal (LDA), encontrando seis variables que mejor explicaron la variación y lograron sexar a los individuos con una precisión del 92.86%. Adicionalmente, se realizaron cortes histológicos teñidos por hematoxilina y eosina, con el propósito de determinar la fase sexual de los individuos junto con la confirmación del sexo por vía directa, encontrando que la única hembra sexada era inmadura a partir de las características de sus ovocitos, mientras que todos los machos eran capaces de espermiar, pero no lo hacían activamente al carecer de esperma libre. Finalmente, se realizó la posterior inducción hormonal empleando Ala6-LHRHa por vía intraperitoneal.

ABSTRACT

The spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) is a native species of Northeastern Mexico, categorized as **Threatened** under NOM-059-SEMARNAT-2010 due to habitat loss and the overexploitation of water bodies. In this context, *ex situ* reproduction stands out as an indispensable tool for its conservation. In Lepisosteids, it is necessary to maintain an adequate sex ratio to achieve successful spawning; therefore, sex identification of individuals is essential. However this group exhibits a gymnoarian or chondrichtine gonadal condition, which hinders the use of traditional sex identification methods, in addition to lacking apparent sexual dimorphism. For this reason, the use of indirect sex identification techniques was proposed, based on the detection of vitellogenin present in plasma and mucus. This molecule was precipitated and subsequently detected through indirect ELISA using anti-VTG antibodies from the tropical gar (*Atractosteus tropicus*). Morphometric variables were also measured to explore potential sexual dimorphism through principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA), identifying six variables that best explained the variation and allowed sexing of individuals with 92.86% accuracy. In addition, histological sections stained with hematoxylin and eosin were performed to determine the gonadal developmental stage and to directly confirm sex. Results showed that the only sexed female was immature, based on oocyte characteristics, while all males were capable of sperming, although they did not release milt. Finally, hormonal induction was carried out using Ala6-LHRHa administered intraperitoneally

1. INTRODUCCIÓN

La conservación de especies acuáticas en riesgo es de interés mundial porque representan el acervo biológico que se puede perder, la mayoría de las veces las amenazas y extinciones son aceleradas por el factor antropogénico (Valiente-Banuet *et al.*, 2015). Cualquier extinción representa un impacto negativo sobre el equilibrio biológico global, se conozca o no el nicho de la especie que se extingue, más aún porque no se conoce el 100% de la biodiversidad, lo que resulta en falta de exactitud en el conocimiento de la crisis actual y pudiera ser mucho más grave de lo estimado (Costello, 2015). En los ecosistemas acuáticos, en especial los terrestres dulceacuícolas, aproximadamente el 0.20% de las especies descritas se han extinguido y más del 4% se encuentran bajo alguna categoría de riesgo (Pereira *et al.*, 2012). Estos ecosistemas en México son particularmente vulnerables (Contreras. y Lozano., 1994; Contreras-Balderas *et al.*, 2008).

Los peces de la familia Lepisosteidae han estado bajo protección con estrategias de conservación dirigidas a mantener la diversidad genética, por ser controladores de poblaciones de otras especies, presentar valor cultural, deportivo y científico (Contreras-Balderas y Ruiz-Campos, 2010; Grande, 2010; Mendoza Alfaro *et al.*, 2008). Al ser uno de los eslabones superiores de la trama trófica, su presencia y respuesta fisiológica responden a factores ambientales que indican la calidad del hábitat, por lo cual es utilizada en el monitoreo ambiental como especie centinela (Cruz-Valdez, 2011). Cabe destacar que mantener los depredadores naturales de los hábitats podría ser cada vez más imperante ante la constante intrusión de las especies exóticas.

La familia Lepisosteidae cuenta con siete representantes distribuidos en dos géneros *Lepisosteus* y *Atractosteus* (Grande, 2010; Wiley, 1976). Estas siete especies se restringen a Norteamérica, Centroamérica y el Caribe (Contreras-Balderas y Ruiz-Campos, 2010; Wiley, 1976). En el género *Lepisosteus*, únicamente *L. oculatus* y *L. osseus* presentan distribución en el Noreste de México (Contreras-Balderas *et al.*, 2004; Contreras-Balderas y Ruiz-Campos, 2010). El catán pinto, *L. oculatus*, se distribuye desde los Grandes Lagos, sureste del Lago Michigan, el Alto Río Mississippi, hasta la Laguna Madre, incluyendo el Río San Fernando y tan al norte en Ontario, Canadá (Contreras-Balderas *et al.*, 2004; Miller, *et al.*, 2009). Las poblaciones presentes en el área del Río Bravo y sus tributarios en México, están sometidos a las presiones antropogénicas, mismas

que han puesto en peligro a otras especies de peces; particularmente para el catán pinto han sido la modificación del hábitat y la sobreexplotación de los cuerpos de agua (Contreras-Balderas *et al.*, 2002, 2008). Estos factores tienen especial repercusión en los sitios donde desovan, ya que dependen de sitios de inundación poco profundos (<1m), mismos que han sido rellenados para el desarrollo urbano y además han sido afectados por la construcción de presas (Mendoza *et al.*, 2002). En general, los factores que comprometen la presencia del catán pinto son la turbidez, las descargas y la carga de sedimentos (Glass *et al.*, 2012; Gray *et al.*, 2012).

El catán pinto es la única especie del género *Lepisosteus* en categoría de riesgo por la NOM-059-SEMARNAT-2010, bajo Amenazada (A). En Canadá está bajo una categoría idéntica (COSEWIC, 2005), por lo que en ese país se han realizado esfuerzos en pro de su conservación (Boothroyd *et al.*, 2016; Glass *et al.*, 2011, 2012, 2015; Gray *et al.*, 2012; McAllister *et al.*, 2023). Aun y estando en la categoría Amenazada (A), en México se desconoce el estatus actual de sus poblaciones, por lo que es imperante emplear técnicas de conservación para esta especie. Cabe mencionar que la IUCN considera a esta especie en la categoría de Preocupación Menor (LC), debido a la estabilidad de las poblaciones en Estados Unidos, a pesar de lo anterior el catán pinto se considera extirpado en Nuevo México y catalogado en algún estatus de riesgo en tres estados de dicho país (Echelle y Grande, 2014).

Por todo esto, ante las amenazas de pérdida de hábitat e intrusión de especies, el catán pinto es una especie que debe ser conservada ya que por sus características fisiológicas y etológicas es un eslabón ecológico importante. La conservación y reproducción en este tipo de peces ha estado ligada a mantener un buen equilibrio entre machos y hembras para mantener el tamaño de las poblaciones, para lo cual en el presente trabajo se plantea usar métodos indirectos para detectar vitelogenina para el sexado de *Lepisosteus oculatus* como mejora en la efectividad de los tratamientos hormonales fuera de su hábitat natural.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diversidad, características distintivas y distribución de Lepisosteidae

La familia Lepisosteidae se caracteriza por particularidades que los hacen ser pancrónicos, es decir comparten características similares a los restos fósiles de sus ancestros (Contreras-Balderas y Ruiz-Campos, 2010) y se ha estimado que aparecieron como grupo hace aproximadamente 180 millones de años (Brito *et al.*, 2017; Echelle y Grande, 2014; Wiley, 1976). Junto con el género *Amia* conforman la infraclase Holostei, grupo monofilético y hermano de los Teleostei (Grande, 2010; Li *et al.*, 2008).

Las siete especies de dos géneros, *Lepisosteus* y *Atractosteus*, comparten características propias como las escamas ganoideas compuestas de dos capas, una de ganoína y otra de isopedina, que recubren su cuerpo cilíndrico y los protege ante los depredadores (Suttkus, 1963). La vejiga natatoria funciona como órgano accesorio que les permite respirar oxígeno atmosférico al ser altamente vascularizada y estar conectada a la faringe, esto les ayuda a soportar bajas concentraciones de oxígeno disuelto, inclusive cercanas a cero (Hill *et al.*, 1973).

El género *Lepisosteus* está comprendido por cuatro especies existentes: el catán pinto (*Lepisosteus oculatus*), el catán aguja (*Lepisosteus osseus*), el catán de Florida (*Lepisosteus platyrhincus*) y el catán nariz corta (*Lepisosteus platostomus*). Se distinguen de *Atractosteus* debido a dos características principales: la sínfisis del dentario ocurre a lo largo de la superficie medial del dentario anterior derecho e izquierdo, con el límite anterior apuntando anteriormente, además los colmillos de los dermopalatinos de los adultos se pierden o están muy reducidos, exceptuando *L. platostomus*, mientras que en *Atractosteus* estos son prominentes en adultos (Grande, 2010). El catán pinto presenta puntos oscuros en la cabeza, el cuerpo y las aletas (Suttkus, 1963).

El catán pinto es de hábitos piscívoros, aunque también se alimenta de crustáceos y larvas de insectos, especialmente durante su etapa larvaria, por lo que es un depredador tope (Ostrand *et al.*, 2004; Tyler y Granger, 1984). Esta condición los vuelve vulnerables a los efectos de la toxicidad aguda por bioacumulación, tanto por el lugar que ocupan en la cadena trófica y su longevidad (Cruz-Valdez, 2011; Watanabe *et al.*, 2003).

2.2 Factores ambientales en la reproducción

Se ha reconocido que las condiciones más importantes que regulan la reproducción en peces son la disponibilidad de alimento y factores ambientales. Se considera que el fotoperiodo y la temperatura tiene gran influencia como estímulos externos para iniciar los ciclos reproductivos al tratarse de organismos poiquiloterms (Mañanós *et al.*, 2009).

El estado de madurez sexual esta influenciado por una talla específica o una edad determinada. La madurez se alcanza siempre y cuando las condiciones ambientales sean las idóneas (Mañanós *et al.*, 2009; Smith, 2008). La disponibilidad de alimento para las crías determina su supervivencia y la temporalidad de la reproducción, ya que una alta disponibilidad de alimento debe coincidir con los periodos críticos de alimentación en larvas y juveniles (Mañanós *et al.*, 2009).

2.3 Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal

La reproducción está controlada por una cascada hormonal a lo largo del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Figura 1). Las gonadotropinas hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son clave en el control endocrino de la reproducción. Dependen de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que es un integrador de los estímulos ambientales. Estas gonadotropinas se liberan al torrente sanguíneo y actúan en la gónada, donde estimulan la síntesis de esteroides, que son los últimos efectores en el desarrollo gonadal. La FSH induce la secreción de andrógenos como la testosterona (T) y estrógenos como el 17β -estradiol (E_2) que controlan la gametogénesis. E_2 juega un rol importante en la síntesis de vitelogenina (VTG) en el hígado. Al final de la gametogénesis la secreción de LH aumenta, estimulando la síntesis de esteroides inductores de maduración (MIS), mismos que inducen la maduración gonadal. Una vez lograda la maduración gonadal, nuevamente aumenta la secreción de LH que induce la ovulación y la espermiación (Mañanós *et al.*, 2009).

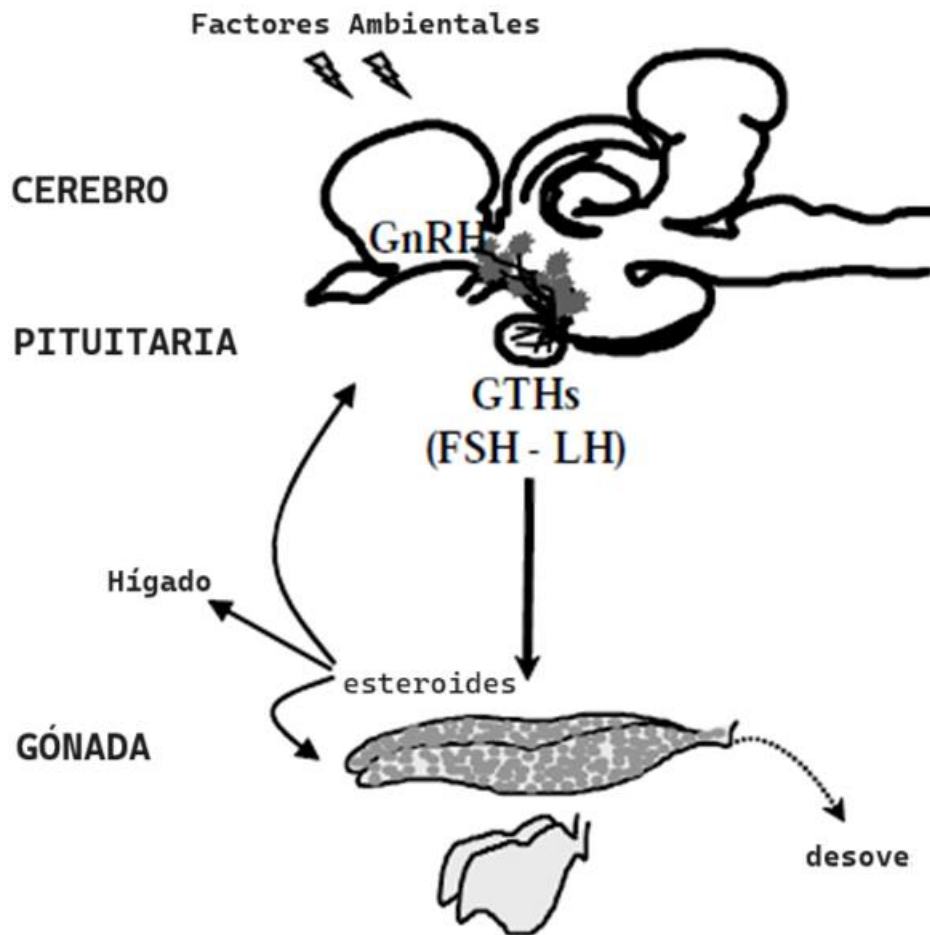


Figura 1. Representación del eje hipotálamo hipófisis gonadal. Adaptado de Mañanós *et al.*, (2008).

2.4 Vitelogénesis

La vitelogénesis (Figura 2) puede ocurrir de manera endógena o exógena. En la vía endógena se forman vesículas de vitelo que son precursoras de los alveolos corticales, los cuales crean el espacio vitelino durante la fecundación. En cambio, en la vitelogénesis exógena se producen gránulos de vitelo cuando el ovocito captura material por micropinocitosis (Barr, 1968; Carrillo, 1987).

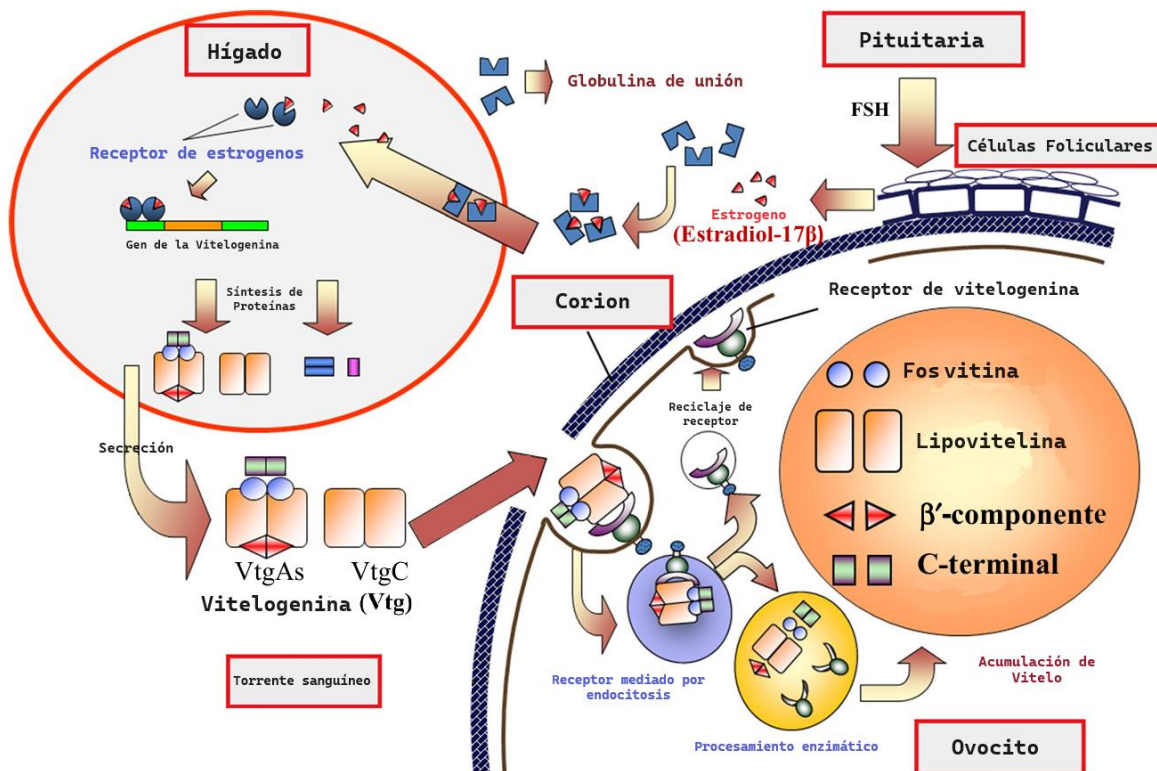


Figura 2. Esquema general de la vitelogénesis. Modificado de Hara *et al.*, 2016.

En general la vitelogénesis consiste en los siguientes pasos: los estrógenos ováricos, especialmente el E₂, inducen la síntesis de vitelogenina en el hígado al unirse a receptores específicos de estrógenos. Posteriormente, la vitelogenina se sintetiza cuando el complejo hormona-receptor activa el gen de la VTG en el Elemento de Respuesta Hormonal. Se inicia la transcripción y se transportan las instrucciones hacia el retículo endoplasmático rugoso (RER) para sintetizar la VTG en los ribosomas. A los polipéptidos de VTG se añaden lípidos y se empaquetan en endosomas para ser transportadas al aparato de Golgi, donde continúan las modificaciones postraduccionales, es decir la glicosilación y fosforilación, para convertirse en una lipoglicofosfoproteína. Ya como lipoglicofosfoproteína es secretada al torrente sanguíneo y viaja hasta ser capturada por lo ovocitos. A su vez, los ovocitos en crecimiento incorporan la VTG a través de receptores específicos. Dentro de los ovocitos se distribuirán los componentes de la VTG según el estado de la vitelogénesis, para finalmente convertirse mediante acción enzimática en los principales componentes del vitelo, como lipovitelininas y fosvitinas de menor peso molecular, que se almacenan en cuerpos esféricos

rodeados de una membrana, posteriormente son acidificados por actividad de la V-ATPasa (Figura 3) (Barr, 1968; Carrillo, 1987; Covens *et al.*, 1987; Hara *et al.*, 2016; Hiramatsu *et al.*, 2002; Ho, 1987; Mommsen y Walsh, 1988; Nagler *et al.*, 1994; Ng y Idler, 1983; Norberg y Haux, 1988; Sullivan y Yilmaz, 2018; C. R. Tyler *et al.*, 1988).

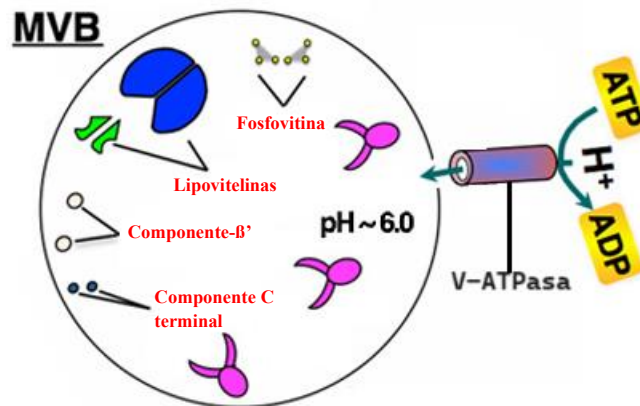


Figura 3. Cuerpos esféricos rodeados de membrana, mediados por V-ATPasa con los componentes de la VTG. Modificado de Sullivan y Yilmaz (2018).

Cabe señalar, que en peces teleósteos, se han reconocido tres formas de VTG, de las cuales dos son formas completas y parálogas (duplicación del mismo gen ancestral), denominadas VTGAa y VTGAb, cuya composición consiste en las proteínas de vitelo previamente descritas (Finn, 2007). A su vez, la tercera forma conocida como VTGC, es incompleta al carecer de fosvitina y una sección importante de la C-terminal (Finn y Kristoffersen, 2007). La diferenciación de estas tres proteínas se da durante la maduración final del ovocito, cuando la VTGAa es clivada en sus componentes hasta formar aminoácidos libres, mientras que la VTGAb y la VTGC permanecen intactas, debido a que los estadios tardíos de las larvas previo a la primera alimentación las aprovechan como fuentes de nutrientes al ser grandes lipoproteínas (Matsubara *et al.*, 2003; Reading y Sullivan, 2011). Existen más conformaciones de estas proteínas en otras especies, sin embargo, estas tres formas son las principales.

2.5 Dimorfismo sexual y técnicas de identificación sexual

En el caso particular del catán pinto, los machos pueden madurar sexualmente antes que las hembras y por ende a una menor talla (Love, 2002, 2004; Smith, 2008; Suttikus, 1963). Por lo tanto,

esta característica se ha empleado como un indicador de dimorfismo sexual y en ocasiones junto con la longitud del hocico (Castillo *et al.*, 2015; Love, 2002). A pesar de lo anterior, esta aproximación está limitada al mostrar una exactitud del 78% (Love, 2002), por lo que es posible realizar identificaciones erróneas.

Existen metodologías directas para evaluar el dimorfismo sexual en peces basadas en la maduración gonádica, entre las que destacan la punción abdominal, la canulación y biopsias (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2001; Shehadeh *et al.*, 1973; Thomaz *et al.*, 2019). Estos métodos son invasivos, pueden requerir el sacrificio de individuos y resultan imprácticos en Lepisosteidos, debido que presentan condición gimnoaria, lo cual implica que los oviductos se conectan con los ductos urinarios y ambos desembocan en un sinus urogenital único (Suttkus, 1963).

Existe un método de sexado para miembros de la familia Lepisosteidae basado en los conductos gonádicos, donde es posible discernir entre el oviducto en hembras y conductos deferentes en machos. A pesar de ser efectivo, es necesario el sacrificio de individuos para poder observar dichas estructuras (Ferrara y Irwin, 2001).

A este respecto, se han implementado métodos de sexado no invasivos a partir de marcadores bioquímicos en otras especies de Lepisosteidos, que se basan en la presencia de VTG en plasma, característica en hembras sexualmente maduras, misma que es un complejo lipoglicocarotenofosfoproteico y es posible detectarlo empleando inmunoensayos (Mendoza *et al.*, 1999). Este tipo de ensayos ya están establecidos en *A. tropicus* (Hernández-Vidal, 2002) para detectar lipovitelina (Cortes-Dávila, 2003) y en *A. spatula*, a partir de un ELISA competitivo (González-Lázcarí, 2007; Santillán-Sosa, 2005).

2.6 Aspectos reproductivos en Lepisosteidos

En el catán pinto ambos sexos pueden madurar previo a los dos años (Love, 2004). La época de reproducción va desde marzo a mayo extendiéndose hasta la primer semana de junio con menor calidad de desoves (Echelle y Riggs, 1972; Tyler y Granger, 1984). Durante este periodo se pueden encontrar en grupos, liderados por una o varias hembras siendo seguidas por mayor número de machos. Suelen invadir áreas de inundación o se les encuentra cercanos a la orilla en zonas ricas en vegetación donde desovan. No presentan cuidado parental y la fertilización es externa.

Estudios histológicos han mostrado que las hembras de *L. oculatus* son capaces de reproducirse todo el año, pero al existir una temporada de reproducción establecida, posiblemente haya un umbral en el tamaño de los ovocitos que necesitan alcanzar para que ocurra la reproducción (Smith, 2008). Por lo cual se hipotetizó la posibilidad de inducir al desove a esta especie fuera de la temporada reproductiva, con resultados satisfactorios (Fontana, 2020).

Es importante señalar que la proporción de sexos es relevante para que ocurra la reproducción, en el caso del catán pinto se señala una proporción macho:hembra deseable que va de 2:1, mientras que para *L. osseus* y *L. platostomus* es de 3:1 (Holloway, 1954).

2.7 Inducción hormonal en *L. oculatus*

En múltiples estudios se ha recurrido a la inducción hormonal en el catán pinto, tanto en estudios enfocados en la reproducción, como en trabajos donde se necesitó recurrir a esta técnica para obtener un cohorte (Tabla 1). Tanto métodos como vías de inducción fueron directos y mostraron distinto éxito reproductivo.

Tabla 1. Protocolos de inducción en el catán pinto (*Lepisosteus oculatus*) implementando distintas hormonas, dosis y vías de administración.

Hormona	Vía	Dosis	Resultados y observaciones	Referencia
GnRH	-	-	500 huevos liberados. Proporción, 1:3 H-M.	(Gray <i>et al.</i> , 2012)
LHRHa	-	1 mg/kg	Desove 26-28 h posterior a inducción, aproximadamente 849 huevos.	(Long <i>et al.</i> , 2020)
GnRH + T ₃	Vía intramuscular	0.5 ml/kg 20 mg/kg	Porcentaje de desoves y eclosión por tratamiento: 60% y 84.6%	(Castillo <i>et al.</i> , 2015)
T ₄		20 mg/kg	75% y 79.8%	
TSH		0.5 ml/kg	75% y 78.4%	
Ovaprim	-	0.5 ml/kg	Una sola hembra y un solo macho inducidos. Al menos se produjo un desove de 500 huevos (alrededor de 2,000).	(Amores <i>et al.</i> , 2011)
Ovaprim	Vía intramuscular	2.0 ml/kg	El desove ocurrió entre 24-48 h posterior a la inducción.	(David, 2012)

			Se indujo una segunda población con la misma dosis, sin éxito.	
Ovaprim	Vía intramuscular	0.5 ml/kg	Se presentó el desove 48 h después de la inducción. El fotoperiodo aplicado fue de 14:10 h.	(Boudreaux, 2005)
Ovaprim	Vía intramuscular	0.5 ml/kg	Desoves exitosos fuera de la temporada de reproducción. Se necesitaron dos aplicaciones a la misma dosis. No hubo diferencia significativa en el desarrollo de larvas comparado con un desove en temporada reproductiva.	(Fontana, 2020)
Ovaprim	-	0.5 ml/kg	Los adultos se mantuvieron en tanques de 2 m de diámetro con sustrato artificial para el desove.	(Braasch <i>et al.</i> , 2014)
Ovaprim	-	0.5 ml/kg	Condiciones similares a Braasch <i>et al.</i> , 2014.	(Annona <i>et al.</i> , 2022)

2.8 Desarrollo embrionario y larvario en Lepisosteidos

Los huevos de los Lepisosteidos son esféricos, con un disco fuertemente adhesivo, el saco vitelino prominente y ovoide, con espacio perivitelino grande. En las larvas persiste el disco adhesivo con el que se adhieren a la vegetación o al sustrato disponible, pero posteriormente se absorbe (Aguilera *et al.*, 2002).

L. oculatus desova en cuerpos de agua poco profundos, loticos y abundantes en vegetación sumergida o flotante (Echelle y Riggs, 1972; Glass *et al.*, 2012). Al eclosionar las larvas tienden a permanecer en el mismo sitio donde fueron desovadas (Glass *et al.*, 2012; McAllister *et al.*, 2023). Si la temperatura es de 32.2°C pueden eclosionar a los dos días y a los cinco días alcanzar la fase de nado libre (Long *et al.*, 2020). En contraste, el porcentaje de eclosión en esta especie es afectado negativamente por la turbidez del medio (Gray *et al.*, 2012). Comparten similitudes morfológicas durante el desarrollo con *L. platyrhincus*, siendo prácticamente idénticas hasta los 125 mm donde comienzan a presentarse diferencias (Echelle y Riggs, 1972).

Se identificaron tres fases nutricionales en larvas de *A. spatula* y *A. tropicus*, iniciando con la fase lecitotrófica, dependen completamente del saco vitelino, fase lecitoexotrófica, comienza la alimentación exógena y la fase exotrófica, cuando dependen de la alimentación exógena y ya han consumido por completo las reservas de vitelo (Aguilera *et al.*, 2002) *A. spatula* presenta un desarrollo digestivo precoz, al evidenciar un estomago funcional y secreción de enzimas similares a pepsinas al inicio de la fase lecitoexotrófica (Mendoza *et al.*, 2002). Se han establecido fases similares en *L. osseus*: lecitotrófica (10-18 mm TL), lecitoexotrófica (18-20 mm TL) y exotrófica (20-26 mm TL) definiendo un periodo crítico de alimentación (20-26 mm TL) que coincide con la fase exotrófica (Pearson y Clark, 1979).

3. JUSTIFICACIÓN

El catán pinto (*Lepisosteus oculatus*), es una especie nativa en el Noreste de México y se encuentra Amenazada de acuerdo con la NOM-059 SEMARNAT-2010 por actividades antropogénicas. Ante este panorama, la conservación *ex situ* representa una herramienta fundamental para resguardar y reproducir individuos de esta especie como parte de estrategias integrales de recuperación. Una etapa clave dentro de estas estrategias de conservación consiste en la identificación precisa del sexo, con el fin de mantener la proporción de sexos óptima para lograr una reproducción exitosa. Sin embargo, debido a la ausencia de dimorfismo sexual evidente y a la poca viabilidad de los métodos tradicionales de identificación en este grupo, se vuelve necesario emplear protocolos de identificación sexual más confiables. Contar con técnicas más precisas contribuye a reducir el estrés en los tratamientos aplicados y a incrementar el éxito en la inducción hormonal y el desove.

4. HIPÓTESIS

La aplicación de métodos indirectos de detección de vitelogenina permite la determinación precisa del sexo en *Lepisosteus oculatus* para mantener la proporción sexual adecuada requerida para la eficacia de los protocolos de inducción hormonal en condiciones *ex situ*.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo General

Identificar el sexo de los individuos de catán pinto por métodos indirectos y posteriormente inducirlos a la reproducción con hormonas.

5.2 Objetivos Particulares

- Realizar un correcto mantenimiento de individuos.
- Determinar las variables morfométricas de los individuos.
- Colectar plasma y mucus de los individuos.
- Precipitar la VTG por el método de precipitación selectiva
- Emplear el método de determinación de vitelogenina fosfato alcalino lábil.
- Sexar a los individuos a partir de ELISA indirecto.
- Establecer una proporción sexual adecuada e inducir a la reproducción a los individuos mediante hormonas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se emplearon 14 individuos de *L. oculatus* en el laboratorio húmedo de Ecofisiología, mismos que han sido resguardados desde hace aproximadamente 15 años sin que se hayan reproducido de forma natural. Los individuos se mantuvieron en tanques circulares de 75 cm de alto, con aireación y rafia verde como enriquecimiento ambiental. Se alimentaron seis veces por semana, alimentándolos con calamar, camarón, pulpo, mejillón y principalmente pescado picado. Se implementó esta dieta seis meses antes de los experimentos y se suspendió la administración de alimento peletizado durante esta etapa.

La toma de muestra se realizó a partir de punción de la vena caudal con aguja de 21 G y vacutainer conteniendo EDTAK₂ como anticoagulante (Figura 4). Se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 ml, se refrigeraron por 1 hora para posteriormente centrifugarse a 15,000 g a temperatura ambiente por 15 minutos. El plasma se colectó en alícuotas de 10 µl o en alícuotas de 100 µl según fueran para la prueba de fosfatos. Se congelaron a -20°C hasta su utilización.



Figura 4. Obtención de la muestra de plasma por punción de la vena caudal con aguja y vacutainer.

Así mismo, a todos los individuos se les tomó muestra de mucus, mediante raspados en el cuerpo. El mucus se colocó en tubos Falcon. Se centrifugaron a 5,000 rpm por 30 min y se alicuotaron en 100 µl de sobrenadante, que fue guardado a -20°C hasta su determinación.

6.2. Precipitación selectiva de VTG plasmática

El procedimiento se llevó a cabo a partir del método de precipitación selectiva de VTG con modificaciones (Johnsen *et al.*, 1999; Silversand *et al.*, 1993; Wiley *et al.*, 1979) a las muestras se agregaron 400 µl de EDTA 20 mM con pH a 7.5 ajustado con NaOH 1 N. Se agregaron 32 µl de $MgCl_2$ 0.5 M y se centrifugó a 2500 g por 35 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y al precipitado se agregaron 150 µl de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5 con 1 M NaCl para resuspenderlo con una varilla de vidrio. Se centrifugó a 2500 g por 35 min a 4°C, se eliminó el precipitado y al sobrenadante se le agregaron 500 µl de agua destilada fría para centrifugar a 2500 g por 35 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 300 µl buffer Tris-HCl 50 mM con PMSF 1 mM pH 8.0.

6.3 Cuantificación indirecta de vitelogenina mediante fosfoproteína alcalina lábil

Se construyó la curva estándar para la posterior cuantificación indirecta (Hallgren *et al.*, 2009). Comenzó con tres repeticiones para cada concentración en una microplaca partiendo del stock de fosfatos con tres reactivos distintos; KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y H_3PO_4 , todos a la misma concentración de 127 µg/ml PO_4^{3-} . El primer pozo se llenó con 50 µl de cada stock de fosfatos y 240 µl de agua destilada. La curva se construyó haciendo siete diluciones seriadas del 50% de la anterior, hasta obtener los siete puntos de la curva por duplicado, cada dilución se realizó con agua destilada, más el blanco que consistió únicamente en 25 µl de NaOH 1M y 120 µl de agua destilada. Posteriormente para la reacción colorimétrica se agregaron 50 µl de solución de molibdato al 1% en H_2SO_4 y 50 µl de ácido ascórbico al 5%. La placa se agitó por 1 min y se incubó durante 1 h en incubadora a 40°C. La lectura de absorbancia se realizó en el lector de microplacas (Biotek, ELx800) a longitud 630 nm.

6.4 ELISA

Un volumen total de muestra de 75 µl se dejó incubar en microplaca de 96 pocillos por 24 horas a 4 °C, posteriormente se decantó y se secó. Después, se realizaron tres lavados con 200 µl de buffer

de lavado (Buffer PBS con Tween al 0.1%), en cada lavado se decantó y se secó el contenido. Se añadió 75 µl de buffer de bloqueo (leche desgrasada y descremada) por cada pocillo a partir de leche descremada y buffer de lavado. Se dejó incubando a temperatura ambiente por 1 hora, se decantó el contenido y se lavó. Por cada pocillo se agregaron 75 µl de los anticuerpos de conejo anti VTG producidos en pejelagarto a concentración 1:1000, dejando incubar por 24 horas a temperatura ambiente. Se decantó el contenido y se realizaron los lavados nuevamente para añadir 75 µl por pocillo de anticuerpo conjugado de proteína A de *Staphylococcus aureus* con HRP y se incubó por una 1 hora. Se decantó el contenido y se lavó, la reacción se realizó añadiendo 50 µl de ABTS, se incubó y se leyó con lector de microplaca (Biotek, ELx800) a 490 nm.

6.5 Inducción al Desove

Durante los tratamientos se mantuvieron en un estanque de concreto para reproductores (1.30 m de alto, 2,90 m de ancho y 6.20 m de largo) al exterior. Manteniendo la calidad del agua con recambios parciales del 20% al menos dos veces por semana. Contando con enriquecimiento ambiental en forma de rafia, refugios de PVC y blocs de concreto. Para poder separar a las parejas se realizaron divisiones con PVC y malla.

Las inducciones se administraron de forma intraperitoneal con el análogo superactivo Ala6-LHRHa 35 µg/kg con un refuerzo a los ocho días y una aplicación de Ovaprim dosis 0.2 ml/kg ocho días después del último refuerzo con el análogo (Hernández-Vidal, 2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Se muestran los tratamientos, la vía de inducción y la dosis.

Tratamiento	Vía	Dosis	Referencia
Ala6-LHRHa	Intraperitoneal	35 µg/kg	(Hernández-Vidal, 2002)
Ovaprim	Intraperitoneal	0.5 ml/kg	(Hernández-Vidal, 2002)

La hormona análogo superactivo Ala6-LHRHa fue preparada en stock diluyendo con suero fisiológico y se alícuotó en un volumen de 100 µl para ser congelada (Hernández-Vidal, 2002). Se tomaron las alícuotas necesarias y se preparó una emulsión hormonal mezclando con aceite de hígado de bacalao en proporción 1:3, integrando con una jeringa de insulina de 1 ml y 30 G x 13

mm para posteriormente aplicarlas en la base de la aleta pélvica (Figura 5). Se aplicó un refuerzo después de ocho días para este ensayo, en total se realizaron cuatro inducciones.



Figura 5. Aplicación de las inyecciones en la base de la aleta pélvica.

6.6 Sexado directo y procesamiento histológico

Se realizaron disecciones a los organismos que fallecieron durante la fase experimental, además de individuos preservados previo a la realización del presente trabajo. La incisión se realizó a lo largo de la línea media de la región ventral, comenzando en la abertura urogenital hasta la región posterior. Las gónadas fueron retiradas y pesadas para determinar el Índice Gonadosomático (IGS) de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$IGS = \frac{(\text{peso de la gónada})}{(\text{peso total del cuerpo})} \times 100$$

Por cada muestra de gónada se tomaron tres secciones; la anterior, media y posterior, se colocaron en casetes con formol al 10% por un máximo de 48 horas. Después se procesaron para deshidratarlas (Tabla 3) empleando etanol al 60°, 70°, 80°, 96° y 100°, se aclararon con etanol 100°-xilol (1:1 vol./vol.), xilol y se incluyeron en parafina (55-60 °C). Este procedimiento se realizó de forma manual.

El desgaste se realizó con microtomo mecánico para remover el exceso de parafina a temperatura ambiente y los cortes se realizaron con un grosor aproximado de 4 μm . Los cortes se colocaron en un baño en Grenetina a 37°C, posteriormente se colocaron en un portaobjetos y se calentaron en horno a 50-55°C por 20 min para remover la parafina.

Posteriormente se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina para su observación bajo microscopio (Tabla 4)

Tabla 3. Pasos de deshidratación, aclarado y preinclusión junto con los reactivos y la temperatura para el procesamiento histológico.

Reactivo	Tiempo	Temperatura
Etanol 60°	1 hora	Ambiente
Etanol 70°	1 hora	Ambiente
Etanol 80°	1 hora	Ambiente
Etanol 96°	1 hora	Ambiente
Etanol 96°	1 hora	Ambiente
Etanol Absoluto	1 hora	Ambiente
Etanol Absoluto	1 hora	Ambiente
Etanol Abs-Xilol (1:1)	1 hora	Ambiente
Xilol	1 hora	Ambiente
Xilol	1 hora	Ambiente
Parafina	1 hora	55°-60° C
Parafina	1 hora	55°-60° C

Tabla 4. Se muestran los pasos de la tinción de Hematoxilina y Eosina.

Reactivo	Tiempo
Xilol	5 min
Etanol-Xilol (30-30)	5 min
Etanol absoluto	2 min
Etanol 96°	2 min
Agua destilada	Inmersión lenta (30 seg)
Hematoxilina	2 min
Agua corriente	2 lavados enjuague lento
Etanol ácido	Inmersión rápida
Agua corriente	Enjuague lento
Agua amoniacal	2 inmersiones rápidos
Agua corriente	2 lavados lentos (30 seg)
Agua destilada	Enjuague lento
Eosina	Seis inmersiones rápidas (10 seg)
Etanol al 96°	Enjuague breve
Etanol absoluto	2 min
Etanol-Xilol	3 min
Xilol puro	2 min
Xilol	3-4 min
Montaje Resina	

6.7 Medidas morfométricas

Las variables morfométricas medidas (Figura 6 y Figura 7) se consideraron según McGrath y Hilton (2012) y McDonald *et al.*, (2014). Para ello se tomaron fotografías de cada individuo en una pecera con agua desclorada y hoja milimétrica (Figura 8, Tabla 5). Las mediciones se realizaron con el software ImageJ.

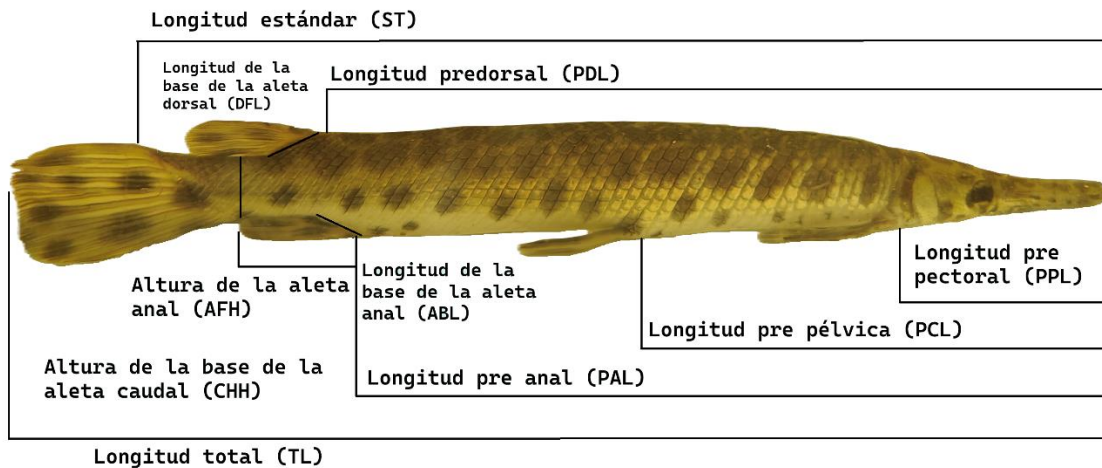


Figura 6. Medidas del cuerpo que se emplearon para el sexado.

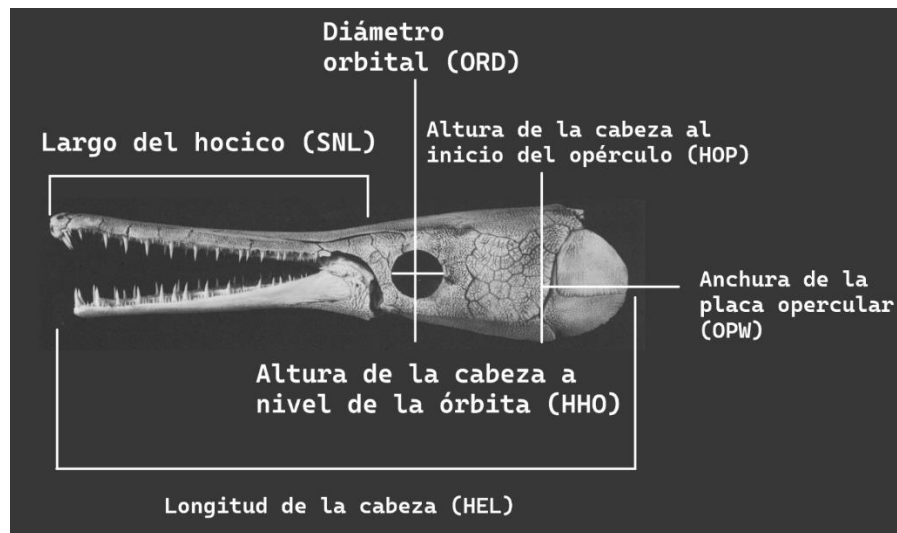


Figura 7. Medidas de la cabeza consideradas para el sexado. Cráneo de *L. oculatus* tomado de Grande (2010).

Tabla 5. Se muestran las siglas y el nombre de las variables medidas en cada organismo (n=14).

Siglas	Variable medida
TL	Longitud total
SL	Longitud estándar
PDL	Longitud predorsal
PPL	Longitud pre-pectoral
PCL	Longitud pre-pélvica
PAL	Longitud pre-anal
AFH	Altura de la aleta anal
ABL	Longitud de la base de la aleta anal
CHH	Altura de la base de la aleta caudal
DFL	Longitud de la base de la aleta dorsal
SNL	Longitud del hocico
ORD	Diámetro orbital
HHO	Altura de la cabeza a nivel de la órbita
HEL	Longitud de la cabeza
OPW	Anchura de la placa opercular
HOP	Altura de la cabeza al inicio del opérculo



Figura 8. Ejemplificación de las fotografías para la medición.

6.9 Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R v4.4.1 y RStudio. Se aplicaron pruebas de normalidad y homocedasticidad a los datos obtenidos para conocer el tipo de prueba a emplear, partiendo de un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Las variables morfométricas fueron analizadas mediante prueba de normalidad con Shapiro-Wilk ($p \leq 0.5$) por cada grupo de sexo y de homocedasticidad por medio de Levene ($p \leq 0.5$), si alguno de los grupos no se ajustaba a la normalidad se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney ($p \leq 0.5$), en dado caso que se ajustaran a la normalidad y no presentaran homocedasticidad se sometían a t de Welch ($p \leq 0.5$), si cumplían con ambos supuestos se empleaba t de Student ($p \leq 0.5$).

Para el Análisis de Componente Principales (PCA), los datos se escalaron con el propósito de ajustarlos a la distribución normal. Se calcularon la desviación estándar y la varianza, posteriormente se calcularon los 3 componentes principales para cada interacción y se graficaron en círculos de correlación y diagrama de dispersión bidimensional.

En el Análisis Discriminante Lineal (LDA) se emplearon las variables seleccionadas que mejor explicaban la variación, añadiendo la columna de sexo. Se empleó el paquete “MASS” para realizar el análisis y predecir los valores en función de los datos utilizados. Posteriormente se graficaron los resultados mediante un diagrama de dispersión para comparar las variables.

7. Resultados

7.1 Mantenimiento de Individuos Experimentales

Los individuos fueron mantenidos en un estanque de reproductores de concreto (Figura 9), siendo alimentados como previamente se expresó (Sección 6.1). Se realizó limpieza de la materia suspendida al menos dos veces por semana y el resto del alimento fue retirado diariamente junto con los recambios del 20%. Los primeros ensayos de inducción se realizaron al interior (Figura 10) para poder controlar la temperatura, debido a que se encontraban fuera de la temporada de reproducción.



Figura 9. Individuos experimentales en el estanque de reproductores de concreto.



Figura 10. Pareja de individuos después de la inducción. Se observa el enriquecimiento ambiental.

7.2 Dimorfismo sexual

Se muestran las medias de cada variable por sexo, junto con la desviación estándar y el rango intercuartílico en milímetros (Tabla 6). De forma general se observa que las medidas para las hembras fueron inferiores comparadas con los machos.

Tabla 6. Medias y desviación estándar por cada variable medida y sexo, además del valor intercuartílico. Todo en milímetros.

Variable	Media Hembras	RIQ	Media Machos	RIQ
TL	464.53±49.95	431.81–470.78	480.80±65.50	430–503.78
SL	376.24±39.04	354.66–387.35	386.46±51.98	356.31–400.41
PDL	333.39±35.87	314.65–346.14	347.36±42.09	318.6–380.41
PPL	109.72±10.88	103.04–121.19	116.77±18.08	100–133.34
PCL	216.88±22.80	198.06–226.8	223.25±28.71	197.51–240.33
PAL	319.98±31.45	298.35–330.08	335.31±40.18	301.58–357.62
AFH	48.54±19.38	45.49–55.92	48.32±15.64	47.43–57.88
ABL	25.63±14.40	17.26–25.15	32.58±13.80	24.26–30.47
CHH	23.42±2.57	21.35–25.99	27.58±4.15	25.21–30.68
DFL	25.58±4.26	22.77–27.78	26.98±4.54	24.09–28.15
SNL	55.27±5.15	22.77–27.78	60.81±12.07	24.09–28.15
ORD	12.32±0.81	11.79–12.71	13.19±2.40	11.41–14.82
HHO	23.67±3.99	22.71–23.77	23.39±3.89	19.69–26.81
HEL	101.55±9.73	92.21–108.3	105.82±18.25	93.42–121.83
OW	16.44±2.85	14.42–16.79	17.87±3.56	15.89–20.64
HOP	30.52±2.97	28.44–31.63	31.63±4.16	27.35–35.89

Para cada variable medida se realizaron pruebas de normalidad por sexo, empleando Shapiro-Wilk y prueba de homocedasticidad, empleando Levene, ambas pruebas considerando un nivel de significancia $p \leq 0.05$. En el caso de que no cumplieran con el supuesto de normalidad ($p \leq 0.05$) se elegía la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, por otro lado, si los datos no mostraban homogeneidad de varianza ($p \leq 0.05$) pero si se ajustaban a la distribución normal, se eligió la t de Welch, si cumplían con la distribución normal y homogeneidad de varianza, se eligió t de Student. El total de organismos medidos fue de 14 (n=14).

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) como una forma de explorar patrones generales de variación y detectar si se presenta alguna tendencia de separación entre los sexos de los individuos, además de seleccionar las variables con más peso. Mostrando las coordenadas de los individuos por interacción en cada espacio discriminante (Figura 11). Determinando que el componente 1 (CP1) explicaba el 11.82%

de la varianza y está fuertemente influenciado por las medidas PCL (Longitud pre-pelvica) que explica el 28.48%, PAL (Longitud pre-anal) que representa el 28.29% y PDL (Longitud predorsal) que corresponde a 28.04%, que corresponden a longitudes del cuerpo (Figura 12 a). Por otro lado, el componente 2 (CP2) explicó el 2.00% de la varianza y fue representado por las medidas AFH (Altura de la aleta anal) con 62.39%, ABL (Longitud de la base de la aleta anal) con 61.69% y SNL (Longitud del hocico) con 23.11%, relacionadas con las aletas anales y la cabeza (Figura 12 b). Por último, el componente 3 (CP3) explicó el 1.30% de la varianza y se compuso por las variables HHO (Altura de la cabeza al nivel de la órbita) con 44.56%, el Peso con 40.78% y ORD (Diámetro orbital) con 31.65%, que se asocia con la robustez de los individuos y la masa corporal (Figura 12 c).

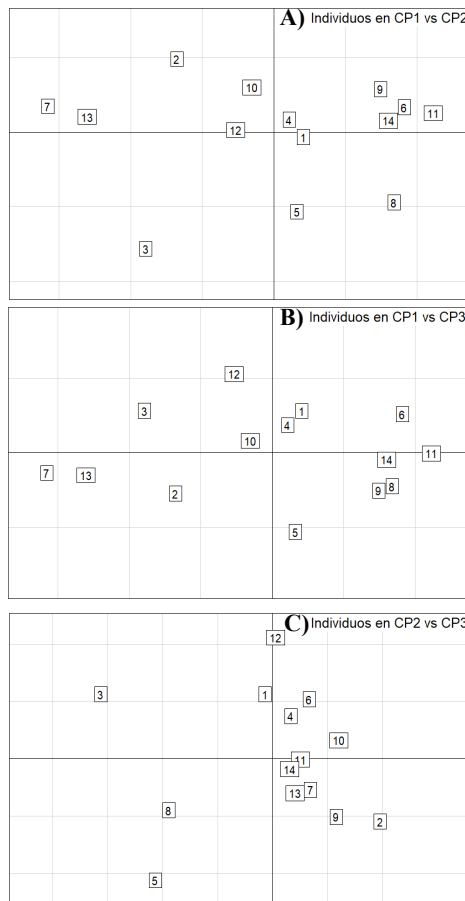


Figura 11. Coordenadas de los individuos con las respectivas interacciones. A) CP1 vs CP2, B) CP1 vs CP3, C) CP2 vs CP3, en el diagrama de dispersión bidimensional.

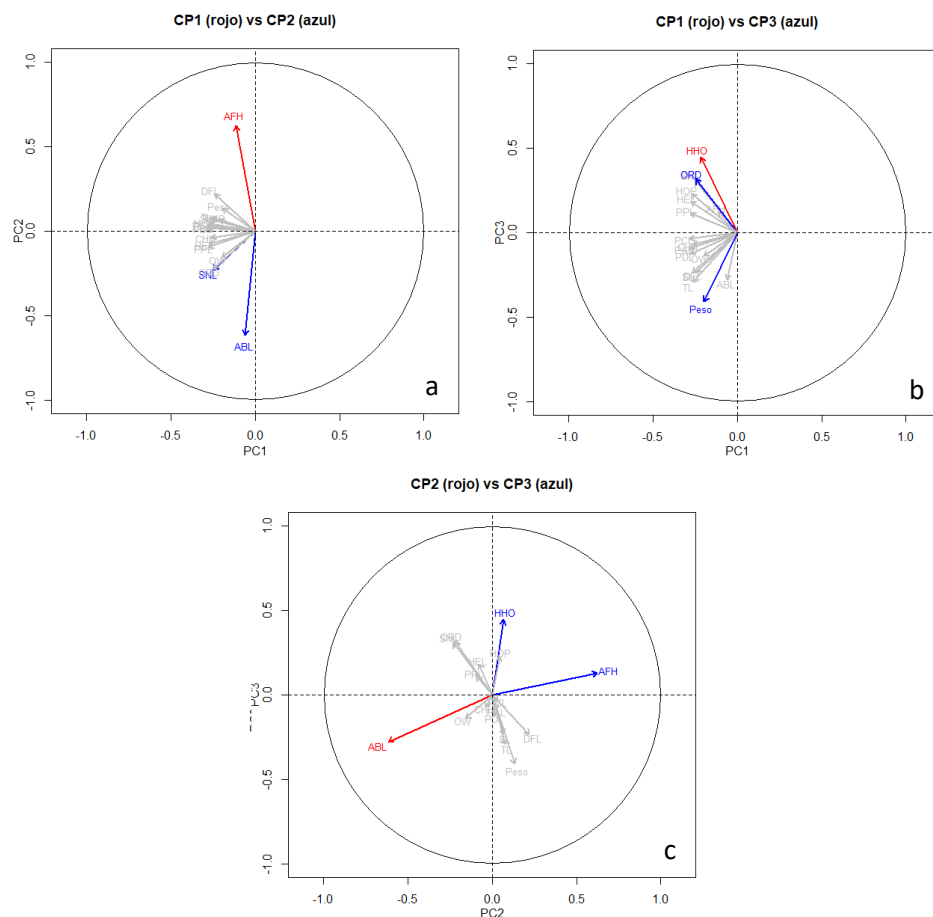


Figura 12. Correlaciones entre CP1vsCP2 (a), Correlación entre CP1vsCP3 (b) y correlación entre CP2vsCP3 (c). Se resaltan en rojo las medidas que mejor explican la variabilidad del eje y, mientras que en azul se resaltan las medidas que mejor explican la variabilidad en el eje x.

Posteriormente se muestran los gráficos de cajas y bigotes de cada medida seleccionada por el PCA, representadas por AFH (Figura 13), ABL (Figura 14), SNL (Figura 15), ORD (Figura 16), HHO (Figura 17) y Peso (Figura 18).

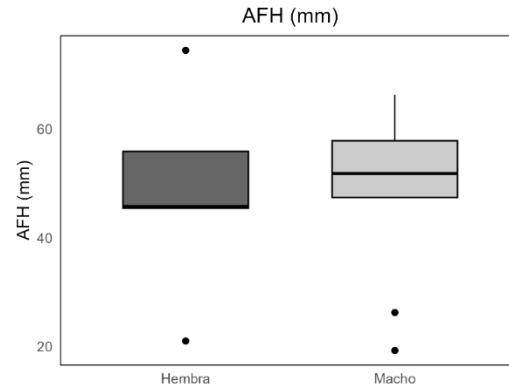


Figura 13. Boxplot donde se muestran la altura de la aleta anal (AFH) en milímetros entre machos y hembras. Es posible observar dos hembras con datos atípicos, una en el límite inferior y otra en el superior. Por el contrario, ambos machos se encuentran en el límite inferior.

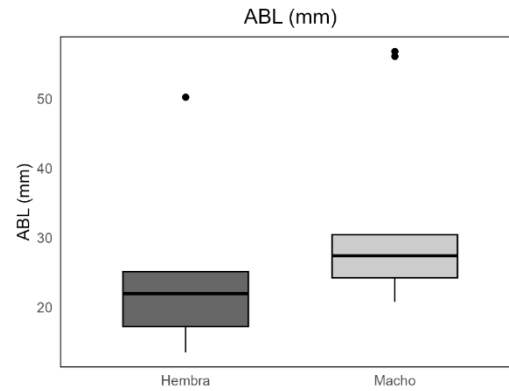


Figura 14. Boxplot donde se muestran la longitud de la base de la aleta anal (ABL) en milímetros entre machos y hembras. Es posible observar una hembra con un dato atípico y dos machos.

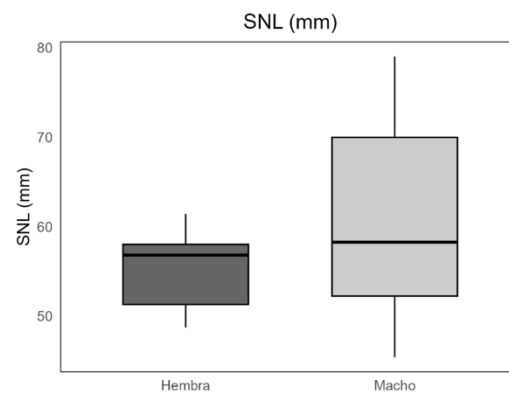


Figura 15. Boxplot donde se muestran la longitud del hocico (SNL) en milímetros entre machos y hembras.

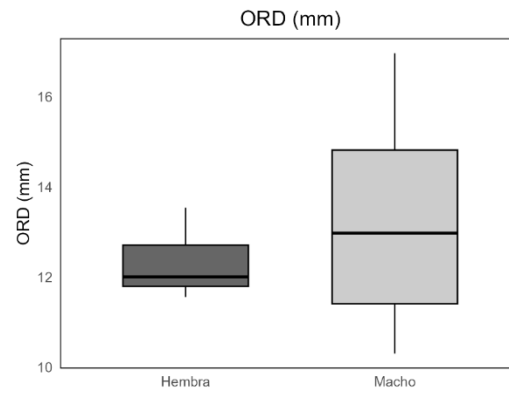


Figura 16. Boxplot donde se muestran el diámetro orbital (ORD) en milímetros entre machos y hembras.

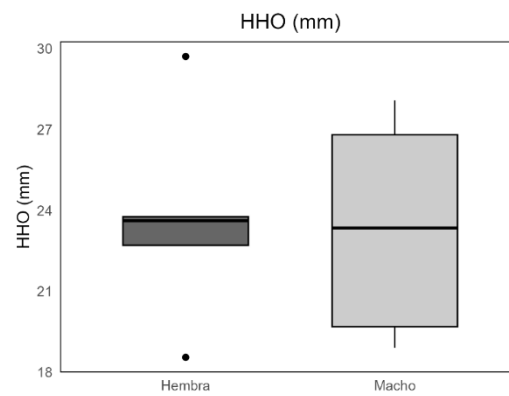


Figura 17 Boxplot donde se muestran la altura de la cabeza a nivel de la órbita (HHO) en milímetros entre machos y hembras.

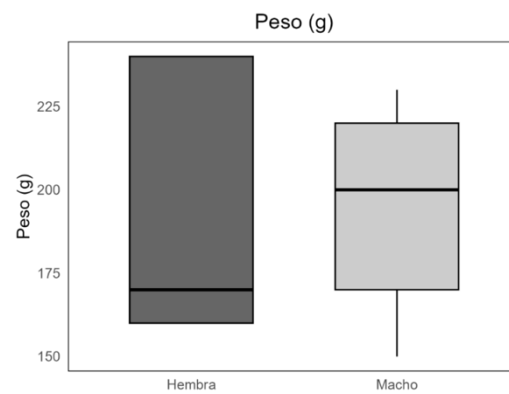


Figura 18. Distribución de pesos en gramos por sexo de los individuos.

Los valores de cada carga y las magnitudes de la interacción entre cada variable por la correlación de cada PCA (Tabla 7). Se resalta la magnitud de las medidas que mejor explican la variación de cada interacción, en la interacción PC1 vs PC2 se resaltan las magnitudes de las medidas AFH (0.634), ABL (0.620) y SNL (0.341). En la interacción PC1 vs PC3 se resaltan las magnitudes de las medidas ORD (0.402), HHO (0.496) y Peso (0.452). Por último, en la interacción PC2 vs PC3 se resaltan las magnitudes de las medidas AFH (0.637), ABL (0.677) y HHO (0.451).

Tabla 7. Se muestran los valores de magnitud por variable entre las interacciones. Se resaltan las variables con mayor magnitud.

Variable	PC1	PC2	PC3	Magnitud CP1vsCP2	Magnitud CP1vsCP3	Magnitud CP2vsCP3
TL	-0.2644	0.0788	-0.2929	0.2759	0.3946	0.3033
SL	-0.2651	0.0698	-0.2351	0.2741	0.3543	0.2452
PDL	-0.2804	0.0153	-0.1274	0.2809	0.3080	0.1283
PPL	-0.2777	-0.0947	0.1144	0.2934	0.3003	0.1485
PCL	-0.2848	0.0334	-0.0381	0.2867	0.2873	0.0507
PAL	-0.2829	0.0267	-0.0923	0.2841	0.2976	0.0961
AFH	-0.114	0.6239	0.1294	0.6342	0.1724	0.6372
ABL	-0.0601	-0.6169	-0.2781	0.6198	0.2845	0.6767
CHH	-0.2629	-0.0386	-0.073	0.2658	0.2729	0.0826
DFL	-0.2408	0.2206	-0.234	0.3265	0.3357	0.3216
SNL	-0.2511	-0.2311	0.3087	0.3413	0.3980	0.3856
ORD	-0.2483	-0.2213	0.3165	0.3326	0.4023	0.3862
HHO	-0.2178	0.069	0.4456	0.2284	0.4959	0.4509
HEL	-0.2747	-0.0764	0.1833	0.2851	0.3302	0.1986
OW	-0.1992	-0.1571	-0.1381	0.2537	0.2424	0.2092
HOP	-0.2711	0.0458	0.2291	0.2750	0.3550	0.2337
Peso	-0.1960	0.1349	-0.4078	0.2379	0.4524	0.4295

Se realizaron las predicciones para el sexado y se confirmaron a partir de los resultados obtenidos en el ELISA de nueve individuos (2, 6, 3, 4, 8, 9, 10, 11 y 12), obteniendo un 92.86% de identificación a partir del modelo (Tabla 8). Se determinaron los valores de LD1 para cada individuo, además de la probabilidad de diferenciar entre macho y hembra, solamente en los individuos 8 (0.6316) y 11 (0.6071) la probabilidad del sexado fue inferior 0.90.

Tabla 8. Predicción obtenida por cada individuo mediante el Análisis Discriminante Lineal. Se muestran las probabilidades de identificar entre hembra y macho.

ID	LD1	Prob Hembra	Prob Macho	Sexo Predicho	Sexo
1	-2.6192	0.9972	0.0028	Hembra	Hembra
2	-1.4123	0.9115	0.0885	Hembra	Hembra
3	0.5483	0.0310	0.9690	Macho	Macho
4	0.6164	0.0256	0.9744	Macho	Macho
5	0.7522	0.0173	0.9827	Macho	Macho
6	0.9114	0.0109	0.9891	Macho	Macho
7	0.8925	0.0115	0.9885	Macho	Macho
8	-0.4371	0.3684	0.6316	Macho	Macho
9	-1.6220	0.9502	0.0498	Hembra	Hembra
10	-3.3732	0.9997	0.0003	Hembra	Hembra
11	-0.4724	0.3929	0.6071	Macho	Hembra
12	2.7323	0.0001	0.9999	Macho	Macho
13	2.0421	0.0004	0.9996	Macho	Macho
14	1.4409	0.0023	0.9977	Macho	Macho

La capacidad del modelo de predecir a los individuos con base en las mediciones seleccionadas fue del 92.86%, debido a que la predicción realizada cambió correspondiente a la predicción *a priori*, con 0.3571 (5 individuos) para hembras y 0.6429 (9 individuos) para machos (Tabla 9).

Tabla 9. Probabilidades *a priori* de pertenecer a un grupo (macho o hembra) predichas con el análisis discriminante lineal.

Sexo	<i>a priori</i>	Predicha
Hembra	0.3571	0.2851
Macho	0.6429	0.7143

La proyección de los individuos en el espacio discriminante (LD1 vs LD1) muestra una separación entre hembras y machos, donde los valores más negativos corresponden a las hembras y el positivo a los machos (Figura 19).

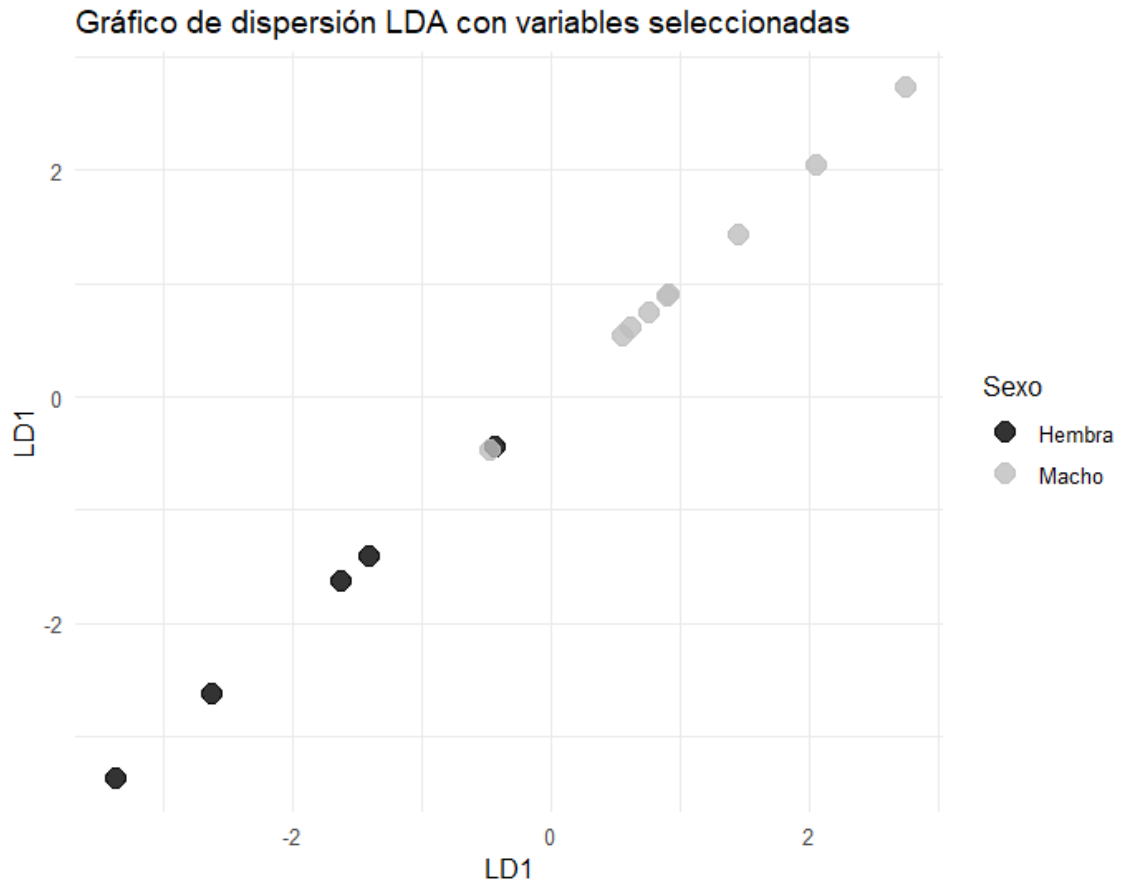


Figura 19. Gráfico de dispersión del Análisis Discriminante Lineal. Se muestra la separación entre hembras (5) y machos (9).

7.3 Cuantificación indirecta de VTG mediante el método ALP

Durante la estandarización del método de detección de VTG por fosfoproteína alcalina lábil (ALP) se verificó que los resultados no estuvieran influenciados por la fuente de fosfatos empleadas, por lo tanto, se optó por emplear tres reactivos distintos KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y H_3PO_4 (Figura 20). Logrando valores de R^2 para KH_2PO_4 de 0.9974, para K_2HPO_4 de 0.9942 y por último H_3PO_4 de 0.9993.

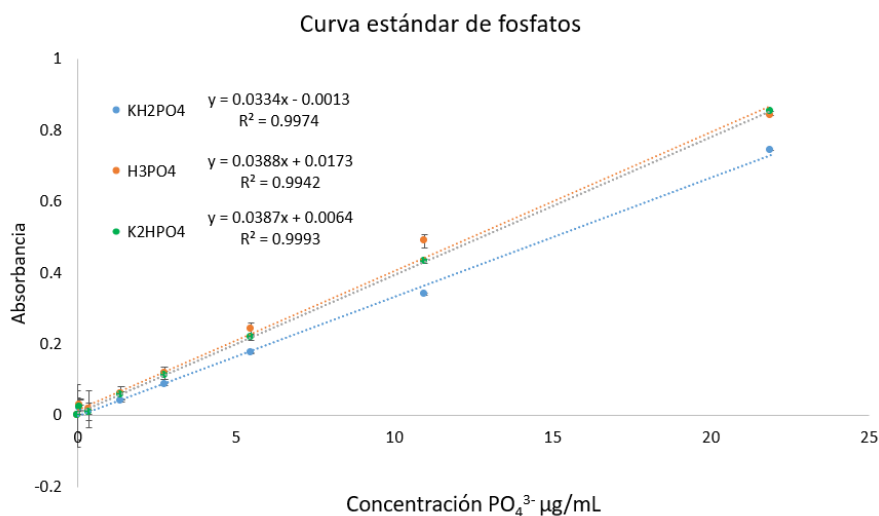


Figura 20 Curva estándar de fosfatos para el método ALP empleando como stock tres reactivos distintos. Se observan la desviación estándar para cada punto.

Posteriormente a manera de obtener valores de referencia de hembras y machos confirmados, se procedió a realizar la cuantificación con muestras de plasma de macho de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), una hembra de catán (*A. spatula*), una hembra de ciclido joya (*Hemichromis guttatus*) y hembra de goldfish (*Carassius auratus*). Estos últimos dos se sexaron a partir de sus características morfológicas. Además, se procesó una muestra de los individuos experimentales (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de fosfatos para cada muestra de los organismos procesados por el método de ALP. Se muestra la desviación estándar.

Especie	PO_4^{3-} $\mu\text{g/ml}$
<i>Atractosteus tropicus</i> ♂	4.51±0.0007
<i>Atractosteus spatula</i> ♀	4.45±0.0014
<i>Lepisosteus oculatus</i> ¿?	4.63±0.0042
<i>Hemichromis guttatus</i> ♀	4.86±0
<i>Carassius auratus</i> ♀	6.10±0.0205

7.4 ELISA indirecto

Se analizaron muestras de plasma y de mucus de los individuos experimentales para determinar el sexo. Además, se utilizaron muestras de plasma de otros Lepisosteidos de sexo confirmados en otros estudios. Adicionalmente se emplearon diluciones de hembra de catán (*Atractosteus spatula*). Entre las especies analizadas se encontraron plasma de macho de catán inducido (con E₂) precipitado (I₂) y sin precipitar (I₂sp), hembra de catán precipitada (Ch) y sin precipitar (Chsp), pejelagarto macho precipitado (Pjm), pejelagarto hembra (Pjh), diluciones de hembra de catán 1:2 (T2), 1:4 (T4), 1:8 (T8) y 1:16 (T16). También se empleó plasma precipitado de goldfish macho (Gm) y goldfish hembra (Gh) para determinar la reacción cruzada con otra especie no relacionada (Figura 21).

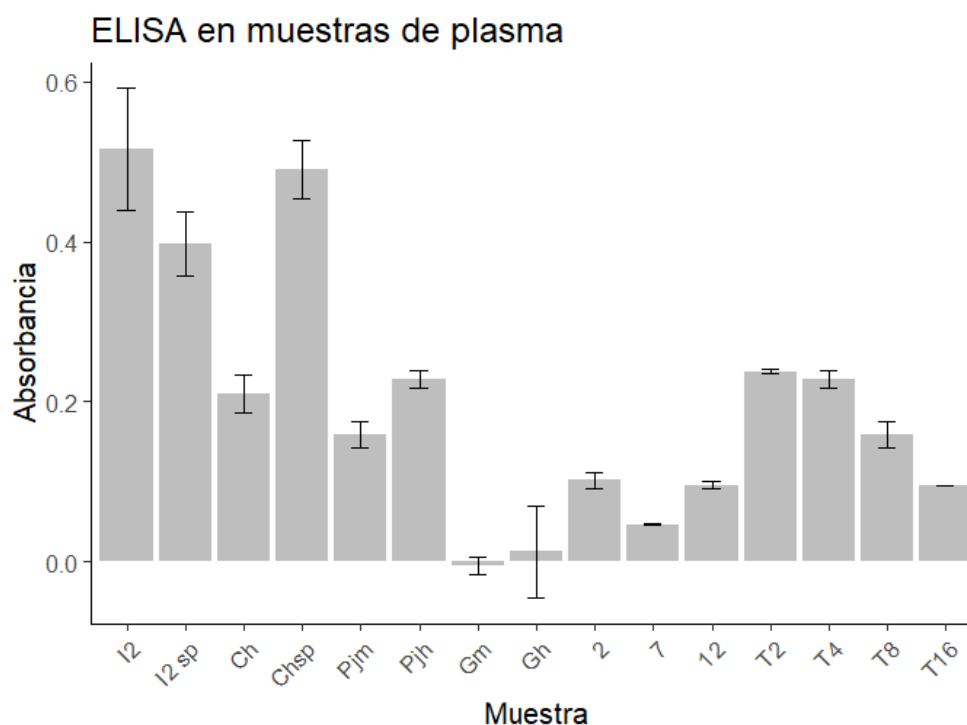


Figura 21. ELISA con muestras de plasma, se muestra la absorbancia y la desviación estándar. I2=Macho de catán inducido, I2= Macho de catán inducido sin precipitar, Ch=Hembra de catán, Chsp=Hembra de catán sin precipitar, Pjm=Pejelagarto macho, Pjh=Pejelagarto hembra, Gm=Goldfish macho, Gh=Goldfish hembra. Individuos 2, 7 y 12 son los individuos experimentales. T2, T4, T8 y T16 son diluciones de plasma de hembra de catán.

Los ensayos de determinación de sexado indirecto se realizaron previo a la primera inducción, posterior a la última inducción y con individuos confirmados de otras especies como *A. spatula* y *A. tropicus* a partir de plasma y mucus (Figura 22). Los valores fueron interpolados a partir de una curva construida con muestras de hembra de catán confirmada.

Las muestras de pos-inducción mostraron diferencia significativa ($p=0.0071$, $t=-3.99$), por lo tanto, es posible confirmar que los individuos 2, 9, 10 y 11 son hembras (Figura 22). En la primera determinación pre-inducción solamente se mostró como hembra al individuo 12, el resto no mostró diferencia significativa.

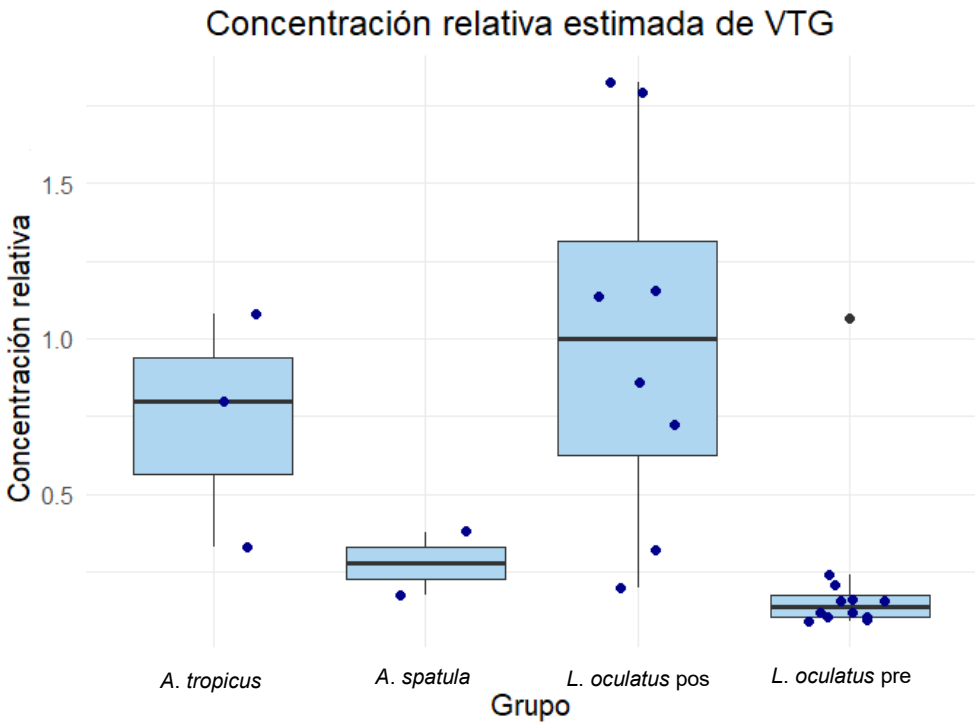


Figura 22. Concentración relativa de VTG a partir de la titulación de muestras de plasma de hembra de catán confirmada, por grupo *A. tropicus*, *A. spatula*, *L. oculatus* previo a la inducción y posterior.

Fue posible separar por grupos a los individuos mediante un análisis por cluster confirmando la separación de sexos (Figura 23).

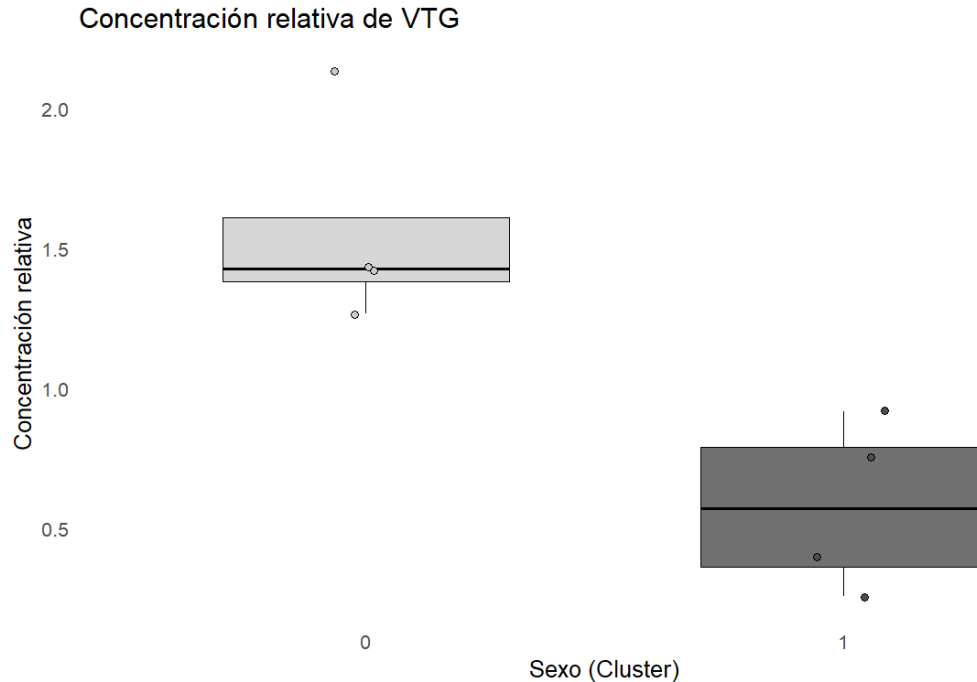


Figura 23. División de sexo por cluster a partir de las lecturas de los individuos. El cluster 0 representa a las hembras y el 1 a los machos.

7.5 Sexado directo

Se realizaron disecciones de cinco individuos que fallecieron durante el primer ensayo de inducciones (Figura 24, 25, 26, 27 y 28), el cual consistió en dos repeticiones con Ovaprim a dosis 0.5 ml/kg, tres individuos por repetición. Al día siguiente de la inducción se encontraron a los individuos sin vida y se tomó muestra de mucus, además de proceder con la disección para el sexado a partir de la revisión de los conductos gonádicos (Ferrara y Irwin, 2001). En cada uno de los individuos se realizó la revisión de ambas gónadas.

Fue posible confirmar que las gónadas se encuentran localizadas a ambos lados de la cavidad abdominal, la gónada derecha de los Lepisosteidos se encuentra desplazada hacia la región anterior, es decir, orientada hacia la región cefálica, mientras que la gónada izquierda se encuentra desplazada hacia la región posterior, orientada hacia la región caudal, esta última es más grande y por lo general más pesada. Además, son de forma ovalada y alargadas.

En el caso particular de la única hembra identificada en base a los ductos, se puede apreciar la falta de ovocitos, por lo tanto, podría tratarse de una hembra inmadura.

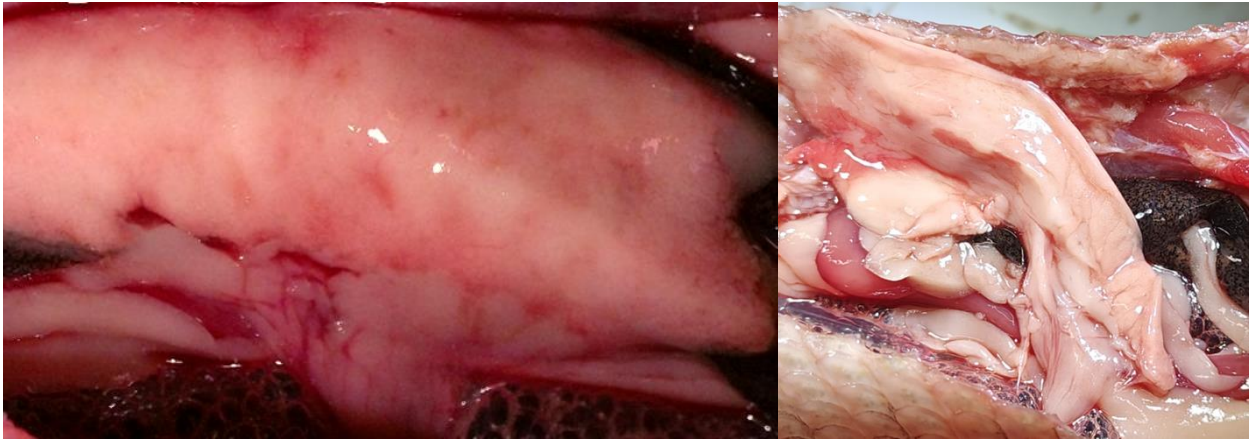


Figura 24. Individuo ID-1. Identificado como hembra.

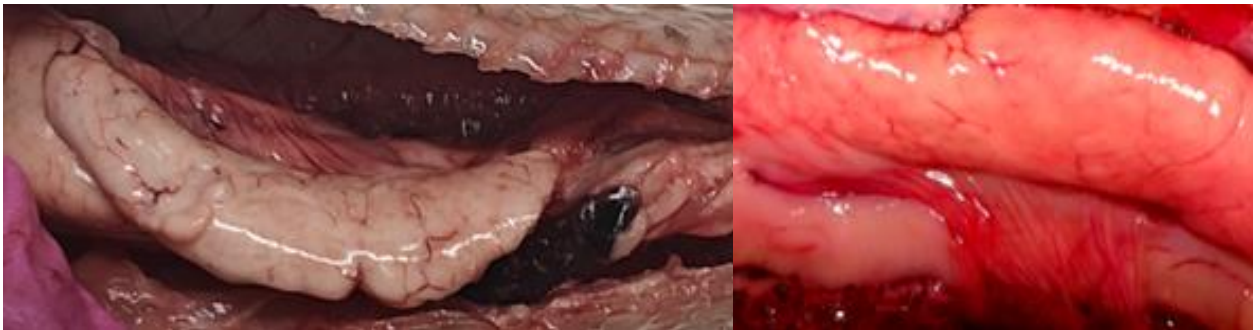


Figura 25. Individuo ID-3. Identificado como macho.

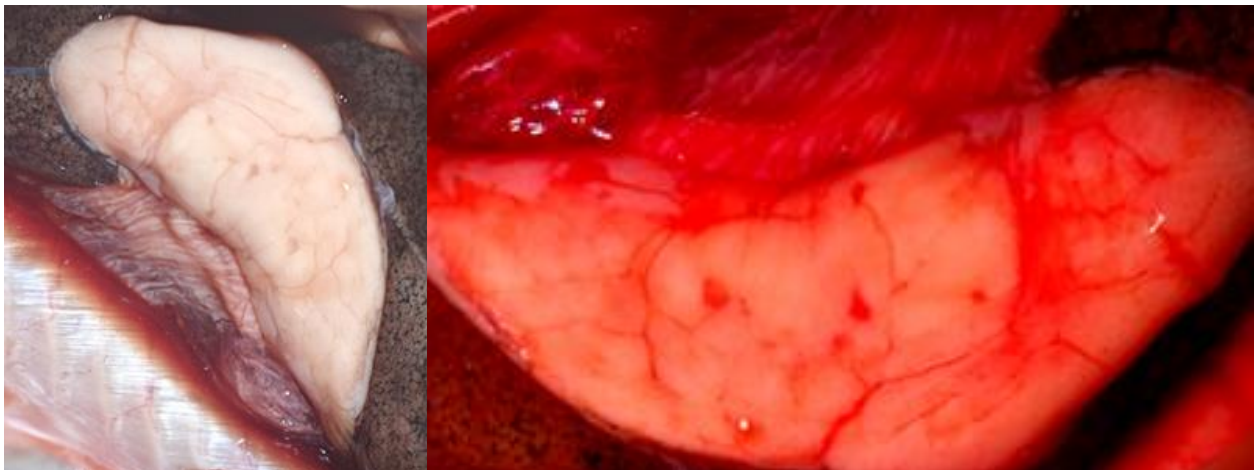


Figura 26. Individuo ID-5. Identificado como macho.

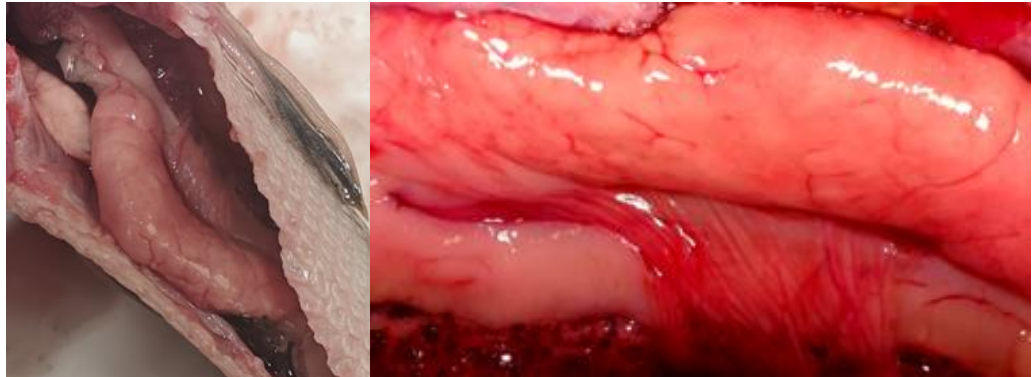


Figura 27. Individuo ID-13. Identificado como macho.

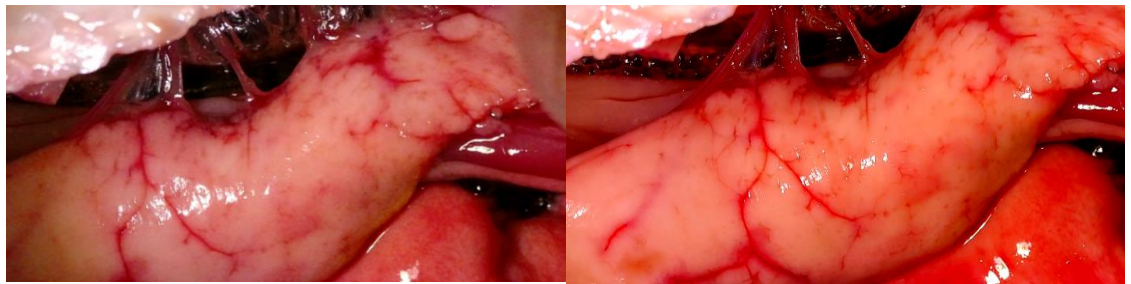


Figura 28. Individuo ID-14. Identificado como macho.

Además, se incluyeron la revisión de dos individuos que habían muerto en años previos al inicio de este trabajo (Figuras 29 y 30). Ambos se identificaron como machos.



Figura 29. Individuo ID-V1. Identificado como macho.



Figura 30. Individuo ID V-2. Identificado como macho.

Se logra apreciar que la gónada para el individuo identificado como ID-1, cuenta con un solo ducto principal (Figura 24), mientras que en resto de los individuos se observan múltiples conductos más pequeños en comparación, por lo tanto, se identificaron como machos (Figura 25, 26, 27, 28, 29 y 30).

7.6 Índice Gonadosomático

Se determinó el índice gonadosomático para los individuos a los cuales se les practicó disección, pesando ambas gónadas en una balanza de precisión. El valor más alto fue de un macho con 2.0135% y el menor de 0.7945%. Por otra parte, la hembra tuvo un valor de 1.8669% (Tabla 11). Únicamente para los machos la media fue de $1.4188\% \pm 0.5267\%$.

Tabla 11. Peso total de ambas gónadas (g), peso de individuo (g) e índice gonadosomático (GSI) por cada individuo y sexo.

Individuo	Sexo	Gónada (g)	GSI (%)
ID-1	Hembra (♀)	2.987	1.8669
ID-3	Macho (♂)	2.010	1.0050
ID-5	Macho (♂)	1.748	0.7945
ID-7	Macho (♂)	2.000	0.8696
ID-13	Macho (♂)	3.381	1.4700
ID-14	Macho (♂)	3.423	2.0135
ID-V1	Macho (♂)	2.692	1.8566
ID-V2	Macho (♂)	4.230	1.9227

Se representan los datos del IGS únicamente para los machos resaltando el valor de la hembra (Figura 31), la media fue de $1.4188\% \pm 0.5267$, la mediana 1.47% y el valor mínimo de 0.7945% y el máximo de 2.0135%. La hembra tuvo un valor de 1.8669%.

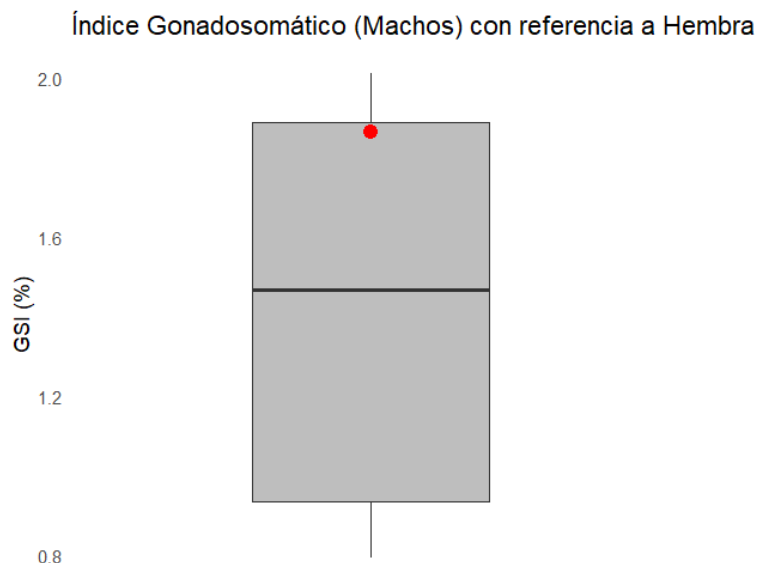


Figura 31. Boxplot donde se muestra la distribución del GSI de los machos con referencia a la única hembra identificada resaltado en rojo.

7.6 Histología

Las muestras sufrieron un proceso de congelamiento y descongelamiento, por lo que es evidente un cierto daño y la alteración de los tejidos (Figura 32). En la única hembra sexada fue evidente la presencia del lumen central, únicamente contaba con ovocitos en los primeros estadios de vitelogénesis y ovogonias corresponden a estadios de desarrollo ovocitario (Figura 32). Inclusive las características macroscópicas de los ovarios indican que no se encontraban en etapa de desove (Figura 26).

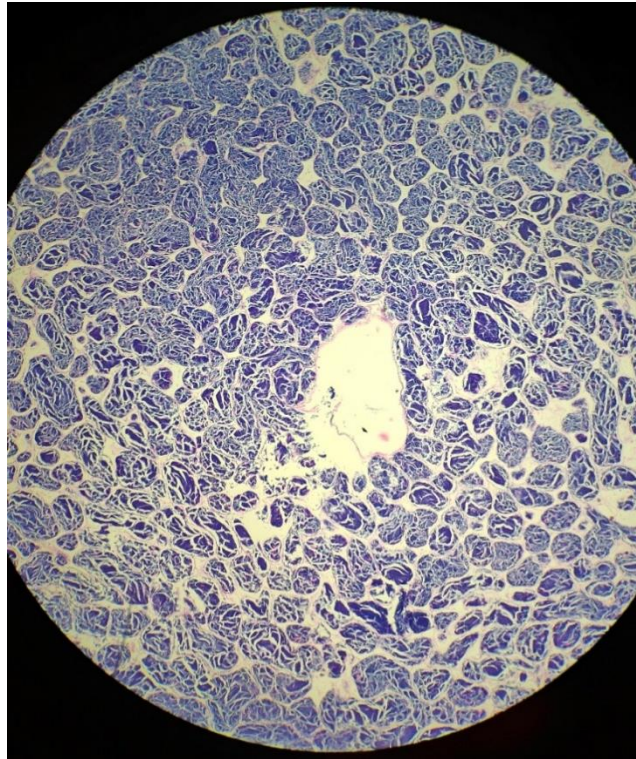


Figura 32. Lumen central en la muestra de hembra. Tinción HyE.

Posteriormente, los machos analizados se encontraban en una etapa donde eran capaces de espermiar, pero no de forma activa, debido a que contaban con lóbulos del epitelio germinal discontinuo y espermatozoo en el lumen, también fue posible discernir presencia de espermatogonias y espermatoцитos primarios (Figura 33).

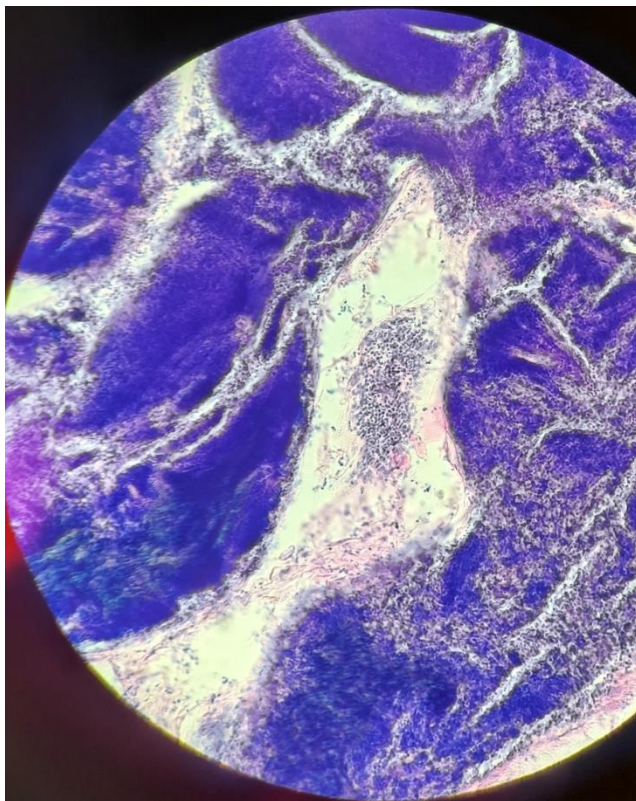


Figura 33. Epitelio discontinuo y presencia de espermatogonias en muestra de un macho. Tinción HyE.

8. DICUSIÓN

8.1 Mantenimiento de los organismos

Un factor importante para la reproducción de esta especie es la lluvia, por lo que la temporada reproductiva está sujeta a la temporalidad de este fenómeno, razón por la cual se realizaron recambios de agua constantes del 10% para simular la temporada de lluvias y mantener la calidad del agua (Hernández-Vidal, 2002). Además, se mantuvo el volumen del agua <1 m intentando simular el hábitat de desove (Frenette y Snow, 2016). Se añadieron cladóceros como fuente de zooplankton para procurar estimular la reproducción al replicar la abundancia de recursos para las posibles larvas (Mañanós *et al.*, 2009) y se alimentaron *ad libitum* con alimento variado seis veces por semana, procurando no emplear alimento formulado durante la temporada de inducciones (Hernández-Vidal, 2002; Márquez-Couturier *et al.*, 2013).

El rango de temperatura para el desove en vida silvestre va de 21°C a 26°C (Cudmore-Vokey y Minns, 2002). Por otro lado, en las inducciones *ex situ* se ha empleado 22°C (Bodin, 2018; Fontana, 2020), en el presente trabajo se mantuvieron a 22.73°C±3.29.

8.2 Precipitación de la VTG

La técnica de precipitación empleada se basa en el incremento de masa de la VTG cuando el complejo formado por EDTA (agente quelante) - MgCl₂ (sal soluble en agua) se une al fósforo presente en la molécula de VTG, la ventaja de este método se presenta en la posibilidad de conservar las proteínas en su forma nativa y volver a disolverlas posteriormente (Cortes-Dávila, 2003; Vela-Valladares, 2003).

La elección de realizar únicamente el precipitado se debió a que en otros estudios donde se purifica la VTG, esta coeluye con otras moléculas de mayor peso molecular, posterior a la cual se realiza cromatografía de exclusión, electroforesis y electroelución, obteniendo VTG purificada, pero en mínimas concentraciones y con tendencia a precipitar, siendo inviable para utilizarse en un ELISA (Santillán-Sosa, 2005).

8.3 ELISA

Fue posible detectar la VTG de *L. oculatus* con los pAb producidos en conejo contra la VTG de *A. tropicus*, esto se debió a que los epítomos inmunogénicos reconocidos en la VTG del pejelagarto son idénticos a los presentes en el catán pinto, lo cual es comparable

con el uso de anticuerpos anti VTG de pejelagarto reaccionando con VTG y VTL de catán, *A. spatula* (Cortes-Dávila, 2003; González-Lázcarí, 2007). Esto indica la cercanía evolutiva entre ambos géneros y las tres especies. En otros trabajos se ha podido demostrar esta capacidad, en ciprínidos con Ab de *Danio rerio* (Brion *et al.*, 2002). En salmónidos con Ab de *Oncorhynchus kisutch* con especies del género *Salmo*, excepto en *S. salar*, atribuyéndolo a diferencias filogenéticas entre dos ramificaciones evolutivas distintas bien definidas (Benfey *et al.*, 1989). Inclusive puede no ser detectada entre especies cercanas debido a diferencias inmunológicas y estructurales causado por las distintas formas de la VTG (Kishida y Specker, 1993; Matsubara *et al.*, 2003). Por otro lado, los anticuerpos policlonales tienen la capacidad de reaccionar con familias de otro orden, evidenciando una mayor reacción cruzada en comparación de los anticuerpos monoclonales (Nilsen *et al.*, 1998), en el presente trabajo se emplearon anticuerpos policlonales.

El mucus puede ser empleado para detectar VTG con el propósito evitar el estrés asociado con la toma de plasma y determinar tanto el sexo como el estatus reproductivo (Gordon *et al.*, 1984; Heppell *et al.*, 1999; Johnsen *et al.*, 1999; Kishida y Specker, 1994, 2000) y además se emplea en estudios con contaminantes estrogénicos (Fenske *et al.*, 2001; Hiramatsu *et al.*, 2006; Kishida *et al.*, 1992; Meucci y Arukwe, 2005; Moncaut *et al.*, 2003; Rey Vázquez *et al.*, 2009; Van Veld *et al.*, 2005). Inclusive se resalta el mucus como una alternativa viable cuando se trabaja con especies en algún estatus de riesgo (Maltais *et al.*, 2010). Especialmente porque los niveles de VTG en plasma y en mucus están correlacionados (Maltais *et al.*, 2010; Meucci y Arukwe, 2005).

Cabe resaltar que las muestras utilizadas, provenientes de pejelagarto macho y hembra, así como de catán macho inducido con E₂ y hembra madura, fueron tomadas hace casi 20 años y estuvieron en ciclos de descongelación y congelación accidental. Por lo tanto, se esperaría cierto grado de degradación en la VTG, a pesar de que las muestras se mantuvieron almacenadas a -40°C (Norberg, 1995; Roy *et al.*, 2004), particularmente por acción de enzimas proteolíticas (Ho, 1987; Matsubara *et al.*, 1999). Por ejemplo, en el plasma de tilapia se ha caracterizado una proteasa serina tipo tripsina responsable de este fenómeno (Inaba *et al.*, 1997). En este sentido, se recomienda el uso de inhibidores de proteasas como la aprotinina y el PMSF. El uso de estos compuestos desde que se tomaron

las muestras inicialmente podría significar que la VTG permanecería relativamente integra hasta su análisis. Por otro lado, el congelamiento y descongelamiento de una muestra de plasma puede provocar la degradación de la VTG, lo cual podría representar una posible sobreestimación de su concentración, como resultado de un incremento en el número de sitios antigénicos disponibles para los anticuerpos (Copeland *et al.*, 1986; Norberg y Haux, 1988).

En la primera determinación pre-inducción para *L. oculatus*, solamente se determinó como hembra al individuo 12, podría tratarse de un falso positivo debido a que la determinación pos-inducción los valores correspondieron a los de un macho, de la misma forma que en el sexado por variables morfométricas.

8.3 Dimorfismo sexual

Previamente se habían propuesto medidas morfométricas que proporcionan dimorfismo sexual en *L. oculatus*, los caracteres dimórficos reflejaban que las hembras eran más largas y tenían un hocico más prolongado que los machos (Love, 2002). Este patrón se repite en *L. osseus* (Johnson y Noltie, 1997; Smylie *et al.*, 2016), *L. platostomus* (Ladonski, 1998) y *L. platyrhincus* (Orlando *et al.*, 2007). Dichas diferencias están atribuidas al tamaño de las gónadas, debido a que las hembras invierten más recursos a la reproducción, lo que se refleja también en mayor GSI (Love, 2002; Smith, 2008). Al no lograr determinar una diferencia significativa entre las medidas ni el peso, puede estar provocado por una posible falta de madurez o estar asociado al cautiverio, ya que son individuos que siempre se mantuvieron en estas condiciones.

El sexado a partir del LDA se realizó con seis variables diferentes, las cuales incluyeron AFH, ABL, SNL, ORD, HHO y Peso, que contribuyeron al modelo para sexar con un porcentaje de probabilidad del 92.82%. Este porcentaje fue superior a los determinados en otros estudios; como *L. oculatus* con 78% (Love, 2002), *A. spatula* 68% (McDonald *et al.*, 2013), 84% para machos y 89% para hembras (McDonald *et al.*, 2018), y comparable para *L. osseus* 93.8% para machos y 91.2% para hembras (McGrath y Hilton, 2012). La selección de estas variables se relaciona con lo encontrado en otras especies, donde los machos presentan aletas más grandes, como *A. spatula*, *L. osseus* y *L. platyrhincus*, especulando que se debe al comportamiento sexual de los machos para diseminar mejor

el esperma en el medio acuático (McDonald *et al.*, 2013, 2018; McGrath y Hilton, 2012; Orlando *et al.*, 2007). Por otro lado, también se presentó en la longitud del hocico, donde se especula que se debe a la necesidad de las hembras de cumplir con una tasa metabólica superior al requerir mayor cantidad de energía destinada a la reproducción, lo que le proporcionaría ventaja al momento de forrajear (Love, 2002; McDonald *et al.*, 2018) e igualmente diferencias en la robustez de la cabeza que se especula una relación similar, la cual va correlacionada con el peso (McDonald *et al.*, 2013, 2018).

La probabilidad obtenida de sexar correctamente a un individuo fue >0.90 , excepto en el individuo 11 que obtuvo una probabilidad de 0.6071 de ser sexado como macho, debido a que en distintas medidas morfométricas se encontraba por debajo en comparación con el resto de los machos. Por otro lado, el individuo 8 *a priori* se identificó como un macho, pero el LDA determinó que se trataba de una hembra con una probabilidad del 0.6316, posiblemente a que el valor obtenido para ABL (50.222 mm) superó por el doble la media de las hembras 25.63 ± 14.40 mm y fue mayor al de los machos 32.58 ± 13.80 mm. Esta variación podría estar sujeta a la falta de representatividad en la muestra ($n=14$) y que en otras aproximaciones se partió de un mínimo de longitud total para procurar trabajar con organismos sexualmente maduros (McDonald *et al.*, 2018).

Cabe resaltar que en presente estudio se trabajó con organismos criados en cautiverio, en estudios previos con diferentes especies se han encontrado cambios en las variables morfométricas al comparar individuos en cautiverio contra poblaciones en vida silvestre (Fagbuaro *et al.*, 2015; González *et al.*, 2016; Hard *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2015), atribuyéndolo a diversas causas, como diferencias en la alimentación, variabilidad en las condiciones ambientales, variabilidad genética (representabilidad de la muestra y dilución génica), diferencias en el hábitat y factores antropogénicos como la sobrepesca (Fagbuaro *et al.*, 2015; Narváez *et al.*, 2023; Solomon *et al.*, 2015; Swain *et al.*, 1991; Von Cramon-Taubadel *et al.*, 2005). Aunado a esto, las condiciones de cautiverio pueden atenuar las diferencias en los caracteres sexuales secundarios, posiblemente debido a la falta de estímulos externos, además, la permanencia prolongada en tanques de forma circular traen consigo otros cambios morfológicos (Hard *et al.*, 2000), incrementando estas diferencias con el tiempo en cautiverio (Pakkasmaa *et al.*, 1998). Lo anterior es relevante debido a

que los individuos crecieron en cautiverio y se mantuvieron por la mayor de su vida en tanques circulares, por lo que las diferencias en la morfología entre hembras y machos podrían estar causada por factores externos.

8.4 Cuantificación indirecta de VTG mediante el método ALP

No se presentó diferencia significativa entre la curva estándar a partir de las tres diferentes fuentes de fosfatos KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y H_3PO_4 , por lo tanto, es posible emplearlas indistintamente para determinar concentraciones de fosfato en plasma.

Al realizar la determinación de fosfatos en plasma de las muestras trabajadas, el plasma de macho *A. tropicus* ($4.51 \pm 0.0007 \text{ PO}_4^{3-} \mu\text{g/ml}$), una hembra de *A. spatula* ($4.45 \pm 0.0014 \text{ PO}_4^{3-} \mu\text{g/ml}$) y una hembra de *H. gutattus* ($4.86 \pm 0 \text{ PO}_4^{3-} \mu\text{g/ml}$), los resultados de las lecturas fueron muy similares, aunque no sean comparables entre sí al ser de especies diferentes. Únicamente en la hembra de goldfish, *C. auratus* ($6.10 \pm 0.0205 \text{ PO}_4^{3-} \mu\text{g/ml}$) se obtuvo una lectura más alta.

Dentro de las desventajas de emplear esta técnica es que la concentración de fósforo no se puede extrapolar directamente a la contenida en la VTG, debido a que no siempre va a formar parte de esta molécula; por lo tanto, se requiere conocer la cantidad de fósforo presente en la VTG (Craik y Harvey, 1984; Rinchard *et al.*, 1997). Otra de las desventajas es la necesidad de emplear mayor cantidad de plasma para poder distinguir entre sexos (Hallgren *et al.*, 2009).

8.5 Sexado directo

Es posible diferenciar las gónadas de Lepisosteidos a partir de examinación macroscópica, la cual indicó diferencias entre los sexos a partir de los conductos gonádicos. En machos se logran observar múltiples hilos, o *vasa efferentia*, que conducen desde los testículos hacia los riñones (Ferrara y Irwin, 2001). En otros machos Lepisosteidos, como el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) consiste en una serie de ductos ordenados de forma radial que originan el conducto principal y uno secundario, conformando una red de ductos que se ramifican e intercomunican, por lo tanto, son anastomosados característico de taxa basal como Holostei (Méndez-Marin *et al.*, 2016). Características que se pudieron determinar en los machos del presente estudio.

Por otra parte, en las hembras se presenta un solo ducto, u oviducto, es continuo y de forma microscópica es posible observar un lumen que va desde el ovario hacia la vejiga (Ferrara y Irwin, 2001). Particularmente los ovarios de las hembras se encuentran sostenidos a la cavidad abdominal mediante el mesovario, son de forma sacular y al tratarse de ovarios sincrónicos desovan todos los huevos en una sola ocasión durante la temporada de reproducción, tal como se ha descrito para los Lepisosteidos (Méndez-Marin *et al.*, 2012; Smith, 2008). Presentaron una cavidad ovárica en el centro, lo cual indica que el ovario es del tipo cistovárico, aunque esta sea una característica de peces más derivados también se presenta en otros Lepisosteidos (Méndez-Marin *et al.*, 2012).

8.6 Índice Gondasomático

El GSI de machos fue de $1.4188\% \pm 0.5267\%$, que al compararlo con poblaciones silvestres los resultados son inferiores, especialmente previo al inicio de la temporada reproductiva (2%) y al final de esta ($>2\%$), solamente es comparable con los valores de abril y mayo ($<1.5\%$), mientras que en los siguientes meses los valores decaen considerablemente al presentarse desoves (Love, 2004). Comparándolo con *A. tropicus* durante la época de reproducción, se obtuvo una media de 2.3% (Méndez-Marin *et al.*, 2016). Este valor es comparable con el más alto obtenido para un macho en el presente trabajo de 2.0135%. Sin embargo, la media se relaciona más con los valores que se obtuvieron durante la época baja de reproducción, durante el mes de octubre $1.52\% \pm 0.71\%$ (Méndez-Marin *et al.*, 2016). Lo que indicaría una falta de madurez en los machos.

En la hembra el valor (1.8669%) se encontraba muy inferior a otros reportados para *L. oculatus* en poblaciones silvestres, debido a que, durante la temporada reproductiva, se determinaron valores mínimos de 8 y máximos de 14 en una población en el estuario Barataria, Luisiana (Smith, 2008), por lo que es evidente la falta de desarrollo en la única hembra sexada de forma directa en este estudio. Solamente podría ser comparable (1.34%) a otras hembras de la misma especie después de desovar (Love, 2004). Por otro lado, en hembras de *A. tropicus*, se determinaron valores en la temporada alta de reproducción de $11.2354\% \pm 1.0647\%$, $n=6$, durante el mes de mayo y en el mes de julio de $12.8705\% \pm 0.6935\%$ (Méndez-Marin *et al.*, 2012), nuevamente valores muy superiores a los de este estudio. La posible falta de madurez en esta hembra también se apoya en la

falta de color en la gónada, donde se puede observar una tonalidad verde oscura previo a la temporada reproductiva (Love, 2004) y oscura cuando están en las últimas fases de la vitelogénesis (Smith, 2008).

8.7 Caracterización Histológica

Inicialmente no se contempló realizar el estudio histológico, por lo tanto, las muestras estaban en congelación y fue evidente la alteración que se presentó en los cortes. Cabe señalar, que la importancia de realizar el estudio histológico se debe a que las gónadas que aparentemente podrían estar en estadio de madurez, debido a su tamaño, en realidad se pueden encontrar en estadio de regresión (Ferrara y Irwin, 2001; León *et al.*, 2004). Por lo tanto, se necesita la confirmación a través de la examinación de las estructuras a nivel microscópico.

Los machos de *L. oculatus* tienen la capacidad de espermiar durante todo el año, sin embargo, se han caracterizado cambios en el epitelio germinal que indican una temporada de reproducción de marzo a mayo, debido a que durante los meses de invierno no se suelen relacionar a la dinámica entre el epitelio germinal discontinuo y continuo al mismo tiempo (Smith, 2008). En el presente estudio, los machos contaron con epitelio discontinuo y continuo al mismo tiempo y espermatogonias en el lumen, siendo más prominentes que los espermatozoos, pero no logran espermiar activamente debido a que no se presentó esperma libre en ninguno de los individuos, siendo indistinguibles estas etapas empleando solamente análisis histológico. En este sentido concuerda con los resultados de otros trabajos donde generalmente los machos se encuentran en capacidad de espermiar (Smith, 2008).

Por otro lado, la única hembra que fue posible diseccionar y determinar sus características histológicas se encontraba en etapa de inmadurez, donde se pudieron determinar se presentaron ovogonias, ovocitos primarios y únicamente en estadios primarios de vitelogénesis, lo cual corresponde a características de hembras que posiblemente nunca hayan desovado, por lo tanto se encontraba en desarrollo (Smith, 2008). Lo anterior concuerda con las características morfológicas superficiales en el ovario y lo determinado por el GSI reforzando el hecho que se trata de una hembra inmadura.

8.8 Respuesta a la inducción

Después de la inducción con Ovaprim a dosis 0.5 ml/kg, se presentó el deceso de 6 individuos un día posterior a la aplicación de la hormona. Es importante mencionar que no se presentan antecedentes de efectos similares en teleósteos al emplear esta hormona, únicamente se cuentan con registros en el anuro *Anaxyrus fowleri*, donde al implementar 300 µl de la hormona, se detectó el deceso de dos individuos machos con alto contenido de fluidos en la cavidad celómica, indicando un efecto antidiurético atribuido al inhibidor de dopamina (Saylor *et al.*, 2024).

A pesar de que anteriormente se expusieron los bajos valores de GSI en los organismos, se ha determinado que los machos de catán pinto maduran sexualmente durante el primer año con una TL de 344 mm, mientras que las hembras maduran al segundo año y una TL de 410 mm (Smith, 2008). Posiblemente la falta de madurez en las hembras se haya reflejado en un tamaño mínimo del ovocito que no lograron alcanzar por la carencia de estímulos externos adecuados que continuaran con el desarrollo vitelogénico y la posterior maduración.

9. CONCLUSIONES

Este trabajo contribuye al estudio de los Lepisosteidos, en especial en la conservación del catán pinto al confirmar la posibilidad de sexar esta especie por métodos indirectos, en este caso ELISA indirecto a partir de pAb anti-VTG producidos en conejo contra la VTG de pejelagarto. Por lo tanto, es posible detectar VTG de distinto género en Lepisosteidos, confirmando su cercanía evolutiva. Al emplear muestras de mucus se puede evitar inducir mayor estrés que el provocado a partir de tomar muestras de plasma y la toma es mucho más sencilla. El ensayo mostró especificidad al no demostrar reacción cruzada con el plasma de goldfish de hembra y macho, por lo tanto, se puede afirmar que los anticuerpos reaccionaron ante la VTG de Lepisosteidos.

Se logró diferenciar los sexos mediante medidas morfométricas, aunque el número de individuos con los que se trabajó influyó en el éxito de este análisis, además que se trabajó con organismos criados en cautiverios durante toda su vida.

La inducción no fue exitosa debido a una falta de madurez en las hembras, confirmado por el GSI y el análisis histológico, aun cuando las condiciones ambientales se procuraron y las inducciones se realizaron dentro de la etapa reproductiva, por lo que se acentúa el empleo de otras aproximaciones como vía indirecta o implementar otras hormonas para aumentar la probabilidad de éxito reproductivo.

10. PERSPECTIVAS

Realizar un housekeeping con otras proteínas de referencia para poder extrapolar las concentraciones de VTG de los individuos estudiados y poder comparar con valores de referencia de otros Lepisosteidos, con el propósito de dar seguimiento al desarrollo hormonal durante la época reproductiva e incrementar el potencial de las inducciones al detectar ventanas de oportunidad durante cada temporada. En otra instancia, purificar VTG específica de catán pinto para lograr este mismo propósito y de forma más precisa.

Reforzar el análisis histológico con los niveles de VTG durante la época reproductiva para fortalecer la correlación entre la fisiología reproductiva y los biomarcadores empleados, en este caso VTG. Además, de validar los anticuerpos mediante Western Blot.

Implementar otras hormonas en la inducción, tal como hormonas tiroideas en conjunto con GnRH, además de TSH por separado. Inclusive explorar la posibilidad de emplear LHRHa con un bloqueador de dopamina endógenos (como domperidona o metoclopramida) en conjunto para complementar el efecto de la inducción, similar a la acción del Ovaprim. Además, comparar el uso de E2 y Testosterona para hembras y machos. En otros trabajos se han realizado inducciones únicamente empleando parejas, es decir un solo macho y una sola hembra (Amores *et al.*, 2011) cuando la disponibilidad de organismos es limitada y evaluar el comportamiento reproductivo.

Comprobar la inducción de esta especie mediante otras vías que no dependan de la vía directa, como por la vía del alimento y directamente en el medio acuático (inmersiones con hormonas), para reducir el estrés asociado al manejo de los organismos. Contemplando los niveles de VTG a partir de muestras de mucus y determinar los tiempos de inmersión más adecuados.

Es importante contemplar este tipo de aproximaciones para en un futuro emplear la información para posibles programas de repoblación o protocolos de inducción *ex situ* más adecuados para la conservación de esta especie.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera C, Mendoza R, Rodríguez G, Márquez G. 2002. Morphological Description of Alligator Gar and Tropical Gar Larvae, with an Emphasis on Growth Indicators. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1315, 899-909.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2002\)131<0899:MDOAGA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2002)131<0899:MDOAGA>2.0.CO;2)
- Alvarez-Lajonchère L, Guerrero-Tortolero, D, Pérez-Urbiola, JC. 2001. Validation of an ovarian biopsy method in a sea bass, *Centropomus medius* Günther: Validation of ovarian biopsy for sea bass. *Aquaculture Research*, 325, 379-384.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00570.x>
- Amores A, Catchen J, Ferrara A, Fontenot Q, Postlethwait JH. 2011. Genome Evolution and Meiotic Maps by Massively Parallel DNA Sequencing: Spotted Gar, an Outgroup for the Teleost Genome Duplication. *Genetics*, 1884, 799-808.
<https://doi.org/10.1534/genetics.111.127324>
- Annona G, Sato I, Pascual-Anaya J, Braasch I, Voss R, Stundl J, Soukup V, Kuratani S, Postlethwait JH, D'Aniello S. 2022. Evolution of the nitric oxide synthase family in vertebrates and novel insights in gill development. *Proceedings of the Royal Society B*, 2891980, 20220667. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0667>
- Barr AW. 1968. Patterns of ovarian cativity. En E. Barrington y J. C. Baker (Eds.), *Perspectives in endocrinology hormones in the lives of lower vertebrates* (p. 583). Academic Press.
- Benfey TJ, Donaldson EM, Owen TG. 1989. An homologous radioimmunoassay for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, with general applicability to other Pacific salmonids. *General and Comparative Endocrinology*, 751, 78-82.
[https://doi.org/10.1016/0016-6480\(89\)90010-5](https://doi.org/10.1016/0016-6480(89)90010-5)
- Bodin E. 2018. *Ammonia production and elimination in Spotted Gar Lepisosteus oculatus embryos and larvae* [Masters Thesis]. Nicholls State University.
- Boothroyd M, Mandrak, NE, Fox M, Wilson, CC. 2016. Environmental DNA (eDNA) detection and habitat occupancy of threatened spotted gar (*Lepisosteus oculatus*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 266, 1107-1119.
<https://doi.org/10.1002/aqc.2617>
- Boudreaux PJ. 2005. *Acute ammonia toxicity and chloride inhibition of nitrite uptake in non-teleost Actinopterygian fishes* [Masters Thesis]. Nicholls State University.
- Braasch I, Guiguen Y, Loker R, Letaw JH, Ferrara A, Bobe J, y Postlethwait JH. 2014. Connectivity of vertebrate genomes: Paired-related homeobox (Prrx) genes in spotted

- gar, basal teleosts, and tetrapods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 163, 24-36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.01.005>
- Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksøyr A, Porcher JM. 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 218, 1699-1708. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210823>
- Brito PM, Alvarado-Ortega J, Meunier FJ. 2017. Earliest known Lepisosteoid extends the range of anatomically modern gars to the Late Jurassic. *Scientific Reports*, 71, 17830. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17984-w>
- Carrillo M. 1987. Reproductive Physiology of Fish and its Relationship with Aquaculture. En J. A. Verreth, M. Carrillo, S. Zanuy, y E. A. Huisman (Eds.), *Aquaculture Research in Latin America. The Latin American Seminar on Aquaculture, International Foundation for Science* (pp. 45-57).
- Castillo S, Bollfrass K, Mendoza R, Fontenot Q, Lazo JP, Aguilera C, Ferrara A. 2015. Stimulatory effect of thyroid hormones improves larval development and reproductive performance in alligator gar (*Atractosteus spatula*) and spotted gar (*Lepisosteus oculatus*). *Aquaculture Research*, 469, 2079-2091. <https://doi.org/10.1111/are.12363>
- Contreras-Balderas S, Lozano-Vilano ML. 1994. Water, Endangered Fishes, and Development Perspectives in Arid Lands of Mexico. *Conservation Biology*, 82, 379-387. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1994.08020379.x>
- Contreras-Balderas S, Almada-Villela P, Lozano-Vilano, MD, García-Ramírez M. 2002. Freshwater fish at risk or extinct in México. A checklist and review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 122/3, 241-251. <https://doi.org/10.1023/A:1025053001155>
- Contreras-Balderas S, Lozano-Vilano ML, García-Ramírez ME, García-DeLeón F, Gutiérrez-Tirad YD. 2004. Peces y aguas continentales del estado de Tamaulipas, Mexico. En S. Contreras-Balderas y M. D. L. Lozano-Vilano (Eds.), *Homenaje al Doctor Andrés Reséndez Medina* (pp. 283-298). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Contreras-Balderas S, Ruiz-Campos G. 2010. Sistemática y Distribución de Catanes, Pejelagartos y Agujas (Familia Lepisosteidae) en México. En R. Mendoza, C. Aguilera, y J. Montemayor (Eds.), *Biología, Ecología y Avances en el Cultivo del Catán Atractosteus spatula* (1.^a ed.). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Contreras-Balderas S, Ruiz-Campos G, Schmitter-Soto JJ, Díaz-Pardo E, Contreras-McBeath, T, Medina-Soto M, Zambrano-González L, Varela-Romero A, Mendoza-Alfaro, R, Ramírez-Martínez C, Leija-Tristán MA, Almada-Villela P, Hendrickson DA, y Lyons J.

2008. Freshwater fishes and water status in México: A country-wide appraisal. *Aquatic Ecosystem Health y Management*, 113, 246-256.
<https://doi.org/10.1080/14634980802319986>
- COSEWIC. 2005. COSEWIC assessment and update status report on the spotted gar *Lepisosteus oculatus* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. 1-17.
- Copeland PA, Sumpter JP, Walker TK, Croft M. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 832, 487-493. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(86\)90400-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90400-1)
- Cortes-Dávila VM. 2003. *Purificación y caracterización de la Lipovitelina ovárica de ejemplares adultos de Atractosteus spatula* [Maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Costello M J. 2015. Biodiversity: The Known, Unknown, and Rates of Extinction. *Current Biology*, 259, R368-R371. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.051>
- Cudmore-Vokey B, Minns CK. 2002. Reproductive ecology and vegetation association databases for Lake Ontario Fishes. Can. MS Rpt. Fish. Aquat. Sci. 2607:ix+42p.
- Covens M, Covens L, Ollevier F, De Loof A. 1987. A comparative study of some properties of vitellogenin (Vg) and yolk proteins in a number of freshwater and marine teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 881, 75-80. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90082-4)
- Craik JCA, Harvey SM. 1984. A biochemical method for distinguishing between the sexes of fishes by the presence of yolk protein in the blood. *Journal of Fish Biology*, 253, 293-303. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04877.x>
- Cruz-Valdez JC. 2011. *Evaluación del catán (Atractosteus spatula) como especie monitora de contaminación utilizando bioindicadores bioquímicos* [Doctorado]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- David SR. 2012. *Life history, growth, and genetic diversity of the spotted gar Lepisosteus oculatus from peripheral and core populations* [Doctoral dissertation]. University of Michigan.
- Echelle AA, Grande L. 2014. Lepisosteidae: Gars. En M. L. Warren y M. B. Brooks (Eds.), *Freshwater fishes of North America* (Vol. 1, pp. 243-278). John Hopkins University Press.

- Echelle AA, Riggs CD. 1972. Aspects of the Early Life History of Gars (*Lepisosteus*) in Lake Texoma. *Transactions of the American Fisheries Society*, 101, 106-112.
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1972\)101<106:AOTELH>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1972)101<106:AOTELH>2.0.CO;2)
- Fagbuaro O, Oso J, Olurotimi M, Akinyemi O. 2015. Morphometric and Meristic Characteristics of *Clarias gariepinus* from Controlled and Uncontrolled Population from Southwestern Nigeria. *Journal of Agriculture and Ecology Research International*, 21, 39-45.
<https://doi.org/10.9734/JAERI/2015/11781>
- Fenske M, van Aerle R, Brack S, Tyler CR, Segner H. 2001. Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 129, 217-232.
- Ferrara AM, Irwin ER. 2001. A Standardized Procedure for Internal Sex Identification in Lepisosteidae. *North American Journal of Fisheries Management*, 21, 956-961.
[https://doi.org/10.1577/1548-8675\(2001\)021<0956:asfis>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8675(2001)021<0956:asfis>2.0.co;2)
- Finn RN. 2007. Vertebrate Yolk Complexes and the Functional Implications of Phosvitins and Other Subdomains in Vitellogenins1. *Biology of Reproduction*, 76, 926-935.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059766>
- Finn RN, y Kristoffersen BA. 2007. Vertebrate Vitellogenin Gene Duplication in Relation to the “3R Hypothesis”: Correlation to the Pelagic Egg and the Oceanic Radiation of Teleosts. *PLoS ONE*, 21, e169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000169>
- Fontana S. 2020. *Growth and development of the Spotted Gar Lepisosteus oculatus spawned out of season* [Masters Thesis]. Nicholls State University.
- Frenette BD, Snow R. 2016. Natural Habitat Conditions in a Captive Environment Lead to Spawning of Spotted Gar. *Transactions of the American Fisheries Society*, 145, 835-838. <https://doi.org/10.1080/00028487.2016.1167776>
- Glass WR, Corkum LD, Mandrak NE. 2011. Pectoral fin ray aging: An evaluation of a non-lethal method for aging gars and its application to a population of the threatened Spotted Gar. *Environmental Biology of Fishes*, 90, 235-242. <https://doi.org/10.1007/s10641-010-9735-5>
- Glass WR, Corkum LD, Mandrak NE. 2012. Spring and Summer Distribution and Habitat Use by Adult Threatened Spotted Gar in Rondeau Bay, Ontario, Using Radiotelemetry. *Transactions of the American Fisheries Society*, 141, 1026-1035.
<https://doi.org/10.1080/00028487.2012.675904>

- Glass WR, Walter RP, Heath DD, Mandrak NE, Corkum LD. 2015. Genetic structure and diversity of spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) at its northern range edge: Implications for conservation. *Conservation Genetics*, 164, 889-899. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0708-2>
- González MA, Rodríguez JM, Angón E, Martínez A, García A, Peña F. 2016. Characterization of morphological and meristic traits and their variations between two different populations (wild and cultured) of *Cichlasoma festae*, a species native to tropical Ecuadorian rivers. *Archives Animal Breeding*, 594, 435-444. <https://doi.org/10.5194/aab-59-435-2016>
- González-Lázcarí M. 2007. *Control reproductivo y larvario del catán (Atractosteus spatula)* [Doctorado]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Gordon R, Owen G, Ternan A, Hildebrand LD. 1984. MEASUREMENT OF A SEX-SPECIFIC PROTEIN IN SKIN MUCUS OF PREMATURE COHO SALMON (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 431-3, 333-339. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90034-6)
- Grande L. 2010. An empirical synthetic pattern study of gars (Lepisosteiformes) and closely related species, based mostly on skeletal anatomy. The resurrection of Holostei. *Ichthyology y Herpetology*, 20102A, 1-871.
- Gray SM, Chapman LJ, Mandrak NE. 2012. Turbidity reduces hatching success in Threatened Spotted Gar (*Lepisosteus oculatus*). *Environmental Biology of Fishes*, 944, 689-694. <https://doi.org/10.1007/s10641-012-9999-z>
- Hallgren P, Mårtensson L, Mathiasson L. 2009. Improved spectrophotometric vitellogenin determination via alkali-labile phosphate in fish plasma—a cost effective approach for assessment of endocrine disruption. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 8914, 1023-1042. <https://doi.org/10.1080/03067310902795944>
- Hara A, Hiramatsu N, Fujita T. 2016. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fisheries Science*, 822, 187-202. <https://doi.org/10.1007/s12562-015-0957-5>
- Hard JJ, Berejikian BA, Tezak EP, Schroder SL, Knudsen CM, Parker LT. 2000. Evidence for Morphometric Differentiation of Wild and Captively Reared Adult Coho Salmon: A Geometric Analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 581, 61-73. <https://doi.org/10.1023/A:1007646332666>
- Heppell SA, Jackson LF, Weber GM, Sullivan CV. 1999. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of Vitellogenin in Temperate Basses (Genus *Morone*): Plasma and In Vitro Analyses. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1283, 532-541. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1999\)128<0532:ELIAEO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1999)128<0532:ELIAEO>2.0.CO;2)

- Hernández-Vidal U. 2002. *Identificación del sexo y evaluación de la inducción hormonal en el Pejelagarto (Atractosteus tropicus)* [Maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Hill LG, Schnell GD, Echelle AA. 1973. Effect of Dissolved Oxygen Concentration on Locomotory Reactions of the Spotted Gar, *Lepisosteus oculatus* (Pisces: Lepisosteidae). *Copeia*, 19731, 119. <https://doi.org/10.2307/1442366>
- Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita T, Sullivan CV, Hara A. 2006. Multiple piscine vitellogenins: Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology*, 1491, 35-47. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0214-z>
- Hiramatsu N, Matsubara T, Weber GM, Sullivan CV, Hara A. 2002. Vitellogenesis in Aquatic Animals. *Fisheries Science*, 68sup1, 694-699. https://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup1_694
- Ho S. 1987. Endocrinology of Vitellogenesis. En D. O. Norris y R. E. Jones (Eds.), *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles* (pp. 145-169). Plenum Press.
- Holloway A. 1954. Notes on the life history and management of the shortnose and longnose gars in Florida waters. *Journal of Wildlife Management*, 184, 440-449.
- Inaba K, Buerano CC, Natividad FF, Morisawa M. 1997. Degradation of Vitellogenins by 170 kDa Trypsin-Like Protease in the Plasma of the Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1181, 85-90. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00028-X)
- Johnsen HK, Tveiten H, Willassen NP, Arnesen AM. 1999. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1243, 355-362. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00132-7)
- Johnson BL, Noltie DB. 1997. Demography, Growth, and Reproductive Allocation in Stream-Spawning Longnose Gar. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1263, 438-466. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1997\)126<0438:dgara>2.3.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1997)126<0438:dgara>2.3.co;2)
- Kishida M, Anderson T, Specker J. 1992. Induction by β -Estradiol of Vitellogenin in Striped Bass (*Morone saxatilis*): Characterization and Quantification in Plasma and Mucus. *General and Comparative Endocrinology*, 881, 29-39. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(92\)90191-L](https://doi.org/10.1016/0016-6480(92)90191-L)
- Kishida M, Specker JL. 1993. Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Induction of two forms by estradiol, quantification in plasma and characterization in oocyte extract. *Fish Physiology and Biochemistry*, 123, 171-182. <https://doi.org/10.1007/BF00004365>

- Kishida M, Specker JL. 1994. Vitellogenin in the surface mucus of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Possibility for uptake by the free-swimming embryos. *Journal of Experimental Zoology*, 2684, 259-268. <https://doi.org/10.1002/jez.1402680402>
- Kishida M, Specker JL. 2000. Paternal Mouthbrooding in the Black-Chinned Tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Pisces: Cichlidae): Changes in Gonadal Steroids and Potential for Vitellogenin Transfer to Larvae. *Hormones and Behavior*, 371, 40-48. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1556>
- Ladonski J. 1998. *Life history traits and age-related changes in reproductive potential of the shortnose gar (Lepisosteus platostomus Rafinesque) in southern Illinois* [Masters Thesis]. Southern Illinois University.
- León FLP, Ochotorena AS, Pérez MM. 2004. Histología de las gónadas masculinas de *Atractosteus tristoechus* (Pisces: Lepisosteidae). *Comunicación Científica CIVA*, 607-615.
- Li C, Lu G, Ortí G. 2008. Optimal Data Partitioning and a Test Case for Ray-Finned Fishes (Actinopterygii) Based on Ten Nuclear Loci. *Systematic Biology*, 574, 519-539. <https://doi.org/10.1080/10635150802206883>
- Long JM, Snow RA, Porta MJ. 2020. Effects of Temperature on Hatching Rate and Early Development of Alligator Gar and Spotted Gar in a Laboratory Setting. *North American Journal of Fisheries Management*, 403, 661-668. <https://doi.org/10.1002/nafm.10397>
- Love JW. 2002. Sexual Dimorphism in Spotted Gar *Lepisosteus oculatus* from Southeastern Louisiana. *The American Midland Naturalist*, 1472, 393-399. [https://doi.org/10.1674/0003-0031\(2002\)147\[0393:sdisgl\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2002)147[0393:sdisgl]2.0.co;2)
- Love JW. 2004. Age, Growth, and Reproduction of Spotted Gar, *Lepisosteus oculatus* (Lepisosteidae), from the lake Pontchartrain estuary, Louisiana. *The Southwestern Naturalist*, 491, 18-23. [https://doi.org/10.1894/0038-4909\(2004\)049<0018:agaros>2.0.co;2](https://doi.org/10.1894/0038-4909(2004)049<0018:agaros>2.0.co;2)
- Maltais D, Roy RL, Couillard CM. 2010. Hybrid ELISAs for vitellogenins of the endangered copper redhorse *Moxostoma hubbsi* and the shorthead redhorse *Moxostoma macrolepidotum* (Cypriniformes, catostomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 735, 883-892. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.03.005>
- Mañanós E, Duncan N, Mylonas C. 2009. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. En E. Cabrita, V. Robles, y P. Herráez (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species* (pp. 3-63). CRC Press Taylor y Francis Group.

- Márquez-Couturier G, Vazquez-Navarrete CJ, Contreras-Sanchez, WM, Alvarez-Gonzalez CA. 2013. *Acuicultura Tropical Sustentable: Una estrategia para la producción y conservación del pejelagarto (Atractosteus tropicus) en Tabasco, México*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Matsubara T, Nagae M, Ohkubo N, Andoh T, Sawaguchi S, Hiramatsu N, Sullivan CV, Hara A. 2003. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 281-4, 295-299.
<https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030559.71954.37>
- Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T, Sullivan CV, Hara A. 1999. Two Forms of Vitellogenin, Yielding Two Distinct Lipovitellins, Play Different Roles during Oocyte Maturation and Early Development of Barfin Flounder, *Verasper moseri*, a Marine Teleost that Spawns Pelagic Eggs. *Developmental Biology*, 2131, 18-32.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9365>
- McAllister K, Drake DAR, Power M. 2023. Habitat preferences of young-of-year spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) in Rondeau Bay, Lake Erie. *Canadian Journal of Zoology*, 1011, 1-10. <https://doi.org/10.1139/cjz-2022-0081>
- McDonald DL, Anderson JD, Hurley C, Bumguardner BW, Robertson CR. 2013. Sexual Dimorphism in Alligator Gar. *North American Journal of Fisheries Management*, 334, 811-816. <https://doi.org/10.1080/02755947.2013.812586>
- McDonald DL, Schlechte JW, Daugherty DJ. 2018. Comparison of Two Biometric Methods for Nonlethal Sex Determination of Alligator Gars. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1474, 711-715. <https://doi.org/10.1002/tafs.10046>
- McGrath PE, Hilton EJ. 2012. Sexual dimorphism in longnose gar *Lepisosteus osseus*. *Journal of Fish Biology*, 802, 335-345. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03174.x>
- Méndez-Marin O, Franyutti AAH, Álvarez-González CA, Uribe MC, Contreras-Sánchez WM. 2016. Permanent germinal epithelium and reproductive cycle of *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) males, Tabasco, México. *Rev. Biol. Trop.*, 64.
- Méndez-Marin O, Hernández Franyutti AA, Álvarez-González CA, Contreras-Sánchez WM, Uribe-Aranzábal MC. 2012. Histología del ciclo reproductor de hembras del pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) en Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*, 604. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i4.2186>
- Mendoza-Alfaro R, González CA, Ferrara AM. 2008. Gar biology and culture: Status and prospects. *Aquaculture Research*, 397, 748-763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01927.x>

- Mendoza R, Aguilera C, Montemayor J, Rodríguez G, Márquez G. 1999. Biología de los Lepidosteidos, y Estudios Orientados Hacia la Recuperación de las Poblaciones Naturales del Catán (*Atractosteus spatula*) (Lacepède, 1803). En *Primera Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura* (pp. 281-291). INP-SEMANARP.
- Mendoza R, Aguilera C, Rodríguez G, Gonzalez M, Castro R. 2002. Morphophysiological studies on alligator gar (*Atractosteus spatula*) larval development as a basis for their culture and repopulation of their natural habitats. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 122, 133-142.
- Meucci V, Arukwe A. 2005. Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 731, 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.021>
- Miller RR, Mincley WL, Norris SM. 2009. *Peces dulceacuícolas de México* (Vol. 1). CONABIO–SIMAC–ECOSUR–DFC.
- Mommsen TP, Walsh PJ. 1988. 5 Vitellogenesis and Oocyte Assembly. En W. S. Hoar y D. J. Randall (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 11, pp. 347-406). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60202-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60202-2)
- Moncaut N, Nostro FL, Maggese MC. 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17b. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology*, 632, 127-137.
[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00175-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00175-3)
- Nagler JJ, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured within lamellae survive well and sequester and process vitellogenin. *Journal of Experimental Zoology*, 2691, 45-52. <https://doi.org/10.1002/jez.1402690106>
- Narváez JC, Acero PA, Blanco RJ. 2023. Variación Morfométrica en Poblaciones Naturalizadas y Domesticadas de la Tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (TELEOSTEI: CICHLIDAE) en el Norte de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 29112, 383-394.
[https://doi.org/10.18257/racefyn.29\(112\).2005.2172](https://doi.org/10.18257/racefyn.29(112).2005.2172)
- Ng TB, Idler DR. 1983. Yolk Formation and Differentiation in Teleost Fishes. En W. S. Hoar, D. J. Randall, y E. M. Donaldson (Eds.), *Fish Physiology. Reproduction Part. A: Endocrine Tissues and Hormones: Vol. IXA* (pp. 373-404). Academic Press.

- Nilsen BM, Berg K, Arukwe A, Goksøyr A. 1998. Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 46:1-5, 153-157. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00019-1)
- Norberg B. 1995. Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) vitellogenin: Induction, isolation and partial characterization. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14:1, 1-13. <https://doi.org/10.1007/BF00004286>
- Norberg B, Haux C. 1988. An homologous radioimmunoassay for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 5:2, 59-68. <https://doi.org/10.1007/BF01875643>
- Orlando EF, Binczik GA, Denslow ND, Guillette LJ. 2007. Reproductive seasonality of the female Florida gar, *Lepisosteus platyrhincus*. *General and Comparative Endocrinology*, 151:3, 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.032>
- Ostrand KG, Braeutigam BJ, Wahl DH. 2004. Consequences of Vegetation Density and Prey Species on Spotted Gar Foraging. *Transactions of the American Fisheries Society*, 133:3, 794-800. <https://doi.org/10.1577/T03-111.1>
- Pakkasmaa S, Ranta E, Piironen J. 1998. A morphometric study on four land-locked salmonid species. 35, 131-140.
- Pearson W, Clark A. 1979. Early piscivory and timing of the critical period in postlarval longnose gar at mile 571 of the Ohio River. *Transactions of the American Fisheries Society*, 40, 122-128.
- Pereira HM, Navarro LM, Martins IS. 2012. Global Biodiversity Change: The Bad, the Good, and the Unknown. *Annual Review of Environment and Resources*, 37:1, 25-50. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-042911-093511>
- Reading BJ, Sullivan CV. 2011. THE REPRODUCTIVE ORGANS AND PROCESSES | Vitellogenesis in Fishes. En *Encyclopedia of Fish Physiology* (pp. 635-646). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00257-4>
- Rey-Vázquez G, Meijide FJ, Da-Cuña RH, Lo-Nostro FL, Piazza YG, Babay PA, Trudeau VL, Maggese MC, Guerrero GA. 2009. Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 150:2, 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.012>
- Rinchard J, Kestemont P, Heine R. 1997. Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. II. Sex steroid and plasma protein phosphorus

- concentrations. *Journal of Fish Biology*, 501, 169-180. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01349.x>
- Roy RL, Morin Y, Courtenay SC, Robichaud P. 2004. Purification of vitellogenin from smooth flounder (*Pleuronectes putnami*) and measurement in plasma by homologous ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1392, 235-244. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.07.006>
- Santillán-Sosa AO. 2005. *Establecimiento de un ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) para cuantificar la vitelogenina del Catán (Atractosteus spatula)* [Licenciatura]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Saylor EM, Kouba AJ, Boudreau MR, Songsasen N, Kouba CK. 2024. Efficacy of salmon GnRHa, Ovaprim® and hCG for hormonal stimulation of spermiation in the Fowler's toad (*Anaxyrus fowleri*). *Conservation Physiology*, 121, coae056. <https://doi.org/10.1093/conphys/coae056>
- Shehadeh ZH, Kuo C, Milisen KK. 1973. Validation of an *in vivo* method for monitoring ovarian development in the grey mullet (*Mugil cephalus* L.). *Journal of Fish Biology*, 54, 489-496. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04478.x>
- Silversand C, Hyllner SJ, Haux C. 1993. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. *Journal of Experimental Zoology*, 2676, 587-597. <https://doi.org/10.1002/jez.1402670606>
- Smith OA. 2008. *Reproductive potential and life history of Spotted Gar Lepisosteus oculatus in the upper Barataria Estuary, Louisiana* [Masters Thesis]. Nicholls State University.
- Smylie M, Shervette V, McDonough C. 2016. Age, Growth, and Reproduction in Two Coastal Populations of Longnose Gars. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1451, 120-135. <https://doi.org/10.1080/00028487.2015.1111256>
- Solomon SG, Okomoda VT, Ogbenyikwu A. I. 2015. Intraspecific morphological variation between cultured and wild *Clarias gariepinus* (Burchell) (Clariidae, Siluriformes). *Archives of Polish Fisheries*, 231, 53-61. <https://doi.org/10.1515/aopf-2015-0006>
- Sullivan CV, Yilmaz O. 2018. Vitellogenesis and Yolk Proteins, Fish. En *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 266-277). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20567-0>
- Suttikus RD. 1963. Order Lepisosteii. En *Fishes of the western North Atlantic: Soft-rayed fishes* (pp. 61-88).
- Swain DP, Riddell BE, Murray CB. 1991. Morphological Differences between Hatchery and Wild Populations of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Environmental versus

- Genetic Origin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 489, 1783-1791. <https://doi.org/10.1139/f91-210>
- Thomaz, MA, Camargo AC, Dos-Anjos BL, Lanes CFC. 2019. Abdominal puncture as a new method to determine sex in tuviras (*Gymnotus* sp.). *Aquaculture Research*, 506, 1651-1657. <https://doi.org/10.1111/are.14046>
- Tyler CR, Sumpter JP, Bromage NR. 1988. In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology*, 2462, 171-179. <https://doi.org/10.1002/jez.1402460209>
- Tyler JD, Granger MN. 1984. *Notes on Food Habits, Size and Spawning Behavior of Spotted Gar in Lake Lawtonka, Oklahoma*.
- Valiente-Banuet A, Aizen MA, Alcántara JM, Arroyo J, Cocucci A, Galetti M, García MB, García D, Gómez JM, Jordano P, Medel R, Navarro L, Obeso JR, Oviedo R, Ramírez N, Rey PJ, Traveset A, Verdú M, Zamora R. 2015. Beyond species loss: The extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology*, 293, 299-307. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12356>
- Van Veld, P. A., Rutan, B. J., Sullivan, C. A., Johnston, L. D., Rice, C. D., Fisher, D. F., y Yonkos, L. T. 2005. A universal assay for vitellogenin in fish mucus and plasma. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2412, 3048-3052. <https://doi.org/10.1897/05-363R.1>
- Vela-Valladares S. 2003. *Fisiología reproductiva de los Lepisosteidos: Estudio de la Vitelogénesis secundaria* [Maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Von Cramon-Taubadel N, Ling EN, Cotter D, Wilkins NP. 2005. Determination of body shape variation in Irish hatchery-reared and wild Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 665, 1471-1482. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00698.x>
- Watanabe K, Desimone F, Thiagarajah A, Hartley W, Hindrichs, A. 2003. Fish tissue quality in the lower Mississippi River and health risks from fish consumption. *The Science of The Total Environment*, 3021-3, 109-126. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00396-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00396-0)
- Wiley EO. 1976. *The phylogeny and biogeography of fossil and recent gars (Actinopterygii: Lepisosteidae)* [Doctorado]. University of Kansas.
- Wiley HS, Opresko L, Wallace RA. 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. *Analytical Biochemistry*, 971, 145-152. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90338-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90338-5)