



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería

Determinación de marcadores genéticos de conducta con potencial de uso en la acuicultura en el pez ciego *Astyanax mexicanus*

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctorado en Ingeniería

Presenta:

Guillermo Abraham Peña Herrejón

Dirigido por:

Dr. Juan Fernando García Trejo

Dr. Juan Fernando García Trejo
Presidente

Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández
Secretario

Firma

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra
Vocal

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Suplente

Firma

Dr. Juvenal Rodríguez Reséndiz
Suplente

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad de Ingeniería

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería

Determinación de marcadores genéticos de conducta con potencial de uso en la acuicultura en el pez ciego *Astyanax mexicanus*

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctorado en Ingeniería

Presenta:
Guillermo Abraham Peña Herrejón

Dirigido por:
Dr. Juan Fernando García Trejo

Dr. Juan Fernando García Trejo
Presidente

Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández
Secretario

Firma

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra
Vocal

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Suplente

Firma

Dr. Juvenal Rodríguez Reséndiz
Suplente

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad de Ingeniería

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 2018
México

RESUMEN

Los marcadores genéticos son secuencias que contribuyen a la aparición de una característica de interés, se destaca su importancia para identificar rasgos que no se pueden seleccionar de manera tradicional, tal como la conducta. El comportamiento en la acuicultura tiene un efecto sobre la domesticación y el bienestar del cultivo, destacando la importancia de la conducta de agresividad, ya que afecta directamente la productividad. Para realizar la investigación de marcadores genéticos conductuales se requiere el uso de organismos modelo, y un candidato para el estudio de la agresividad es el pez modelo *Astyanax mexicanus*. *A. mexicanus* presenta poblaciones de superficie (PS) y de cueva (PC) que evolucionaron independientemente, obteniendo fenotipos de PS altamente agresivos, con interacciones jerárquicas complejas, y fenotipos de PC que perdieron su agresividad, lo que permite realizar estudios comparativos de alta y baja agresividad. Con el fin de cultivar las diferentes poblaciones de *A. mexicanus* se diseñó un sistema de cultivo modular con la capacidad de inducir la reproducción de la especie mediante un gradiente de temperatura. Se capturaron PS y PC para su mantenimiento y uso como modelos de estudio, caracterizándolos por su nivel de agresividad. Se estableció una metodología para la cuantificación del nivel de agresividad de la especie mediante el número de ataques por minuto, con una diferencia de más del 60% entre los PS más agresivos y los PC, identificando PS con agresividad alta, PS con agresividad media y PC con muy baja agresividad. Dependiendo de su nivel de agresividad las poblaciones se caracterización mediante la expresión diferencial de genes candidatos al control de la agresividad. Se encontró un efecto en el control de la agresividad debido al transportador de serotonina y al receptor de serotonina B, con una correlación de -0.9 y -0.85 respectivamente. El aumento en la expresión de estos genes se relaciona con la disminución de la agresividad por lo que se propone el uso de la expresión de estos genes como un marcador genético para la identificación temprana del nivel de agresividad en *A. mexicanus*.

(Palabras clave: sardinita mexicana, genes candidatos, agresividad en la acuicultura, sistema de cultivo acuícola en rack, cuantificación de la agresividad)

SUMMARY

Genetic markers are sequences that contribute to the appearance of a characteristic of interest, highlighting its importance to identify traits that cannot be selected in a traditional way, such as behavior. Behavior in aquaculture influences the domestication and welfare of the crop, highlighting the importance of aggressive behavior, as it directly affects productivity. To carry out the investigation of behavioral genetic markers, the use of model organisms is required and a candidate model for the study of aggression is the fish *Astyanax mexicanus*. *A. mexicanus* presents surface (PS) and cave (PC) populations that evolved independently, obtaining highly aggressive PS phenotypes, with complex hierarchical interactions, and PC phenotypes that lost their aggressiveness, what allows comparative studies of high and low aggressiveness. In order to cultivate the different populations of *A. mexicanus*, a modular culture system was designed with the capacity to induce the reproduction of the species by means of a temperature gradient. PS and PC were captured for their maintenance and use as study models, characterizing them by their level of aggressive behavior. A methodology was established to quantify the level of aggressiveness of the species by means of the number of attacks per minute, with a difference of more than 60% between the most aggressive PS and the PC, identifying PS with high aggressiveness, PS with medium aggressiveness and PC with very low aggressiveness. Depending on their level of aggressiveness, populations were characterized by the differential expression of candidate genes for the control of aggressiveness. An effect was found in the control of aggressiveness due to the serotonin transporter and the serotonin B receptor, with a correlation of -0.9 and -0.85 respectively. The increase in the expression of these genes is related to the decrease in aggressiveness, therefore the use of the expression of these genes as a genetic marker for the early identification of the level of aggressiveness in *A. mexicanus* is proposed.

(Key words: Mexican tetra, candidate genes, aggressiveness in aquaculture, rack aquaculture system, quantification of aggressiveness)

DEDICATORIA

A mi esposa Julieta y mi hijo Sebastián,
por ser el motivo de mi esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Fernando García Trejo y al Dr. Andrés Cruz Hernández, que gracias a ellos es que se realizó este proyecto.

Al sínodo que revisó este trabajo y dieron valiosas aportaciones que permitieron su finalización.

A los integrantes del laboratorio de Bioingeniería y los trabajadores del Campus Amazcala y Campus Conca que aportaron de su tiempo cuando más lo requería.

Al CONACyT que con su apoyo logré dedicarme de forma adecuada a este trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por darme un lugar donde crecer intelectualmente.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Descripción del problema	3
1.3. Justificación.....	5
1.4. Hipótesis	6
1.5. Objetivos	6
1.5.1. Objetivo general	6
1.5.2. Objetivos particulares.....	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. Sistema acuícola.....	7
2.2. Comportamiento de los peces	9
2.2.1. Importancia del comportamiento de los peces en la acuicultura	9
2.2.2. Conducta de agresividad en la acuicultura	11
2.2.3. Conducta de agresividad y neurotransmisores.....	13
2.2.4. Cuantificación del comportamiento de agresividad	16
2.3. Selección genética	18
2.3.1. Selección genética en la acuicultura.....	19
2.3.2. Marcadores genéticos	20
2.3.3. QTL (Quantitative trait loci)	21
2.4. <i>Astyanax mexicanus</i>	23
2.4.1. Características distintivas.....	23
2.4.2. Distribución geográfica.....	24
2.4.3. Biología y cultivo	25
2.4.4. Reproducción	26

2.4.5.	Potencial <i>Astyanax mexicanus</i> como modelo de estudio.....	27
2.4.1.	Comportamiento de <i>Astyanax mexicanus</i>	29
2.5.	Principales grupos de investigación	33
3.	METODOLOGÍA.....	35
3.1.	Diagrama general	35
3.2.	Implementación de un sistema de cultivo para diferentes poblaciones de <i>Astyanax mexicanus</i>	35
3.2.1.	Sistema en rack.....	36
3.2.2.	Sistema de filtración	38
3.2.3.	Regulación de temperatura y fotoperiodo.....	39
3.2.4.	Pruebas de funcionamiento para mantenimiento	39
3.2.5.	Pruebas de funcionamiento para la inducción de reproducción.....	40
3.3.	Linajes de <i>Astyanax mexicanus</i>	41
3.3.1.	Captura de poblaciones silvestres	41
3.3.2.	Reproducción de poblaciones silvestres.....	42
3.3.3.	Determinación del sexo para la selección de reproductores.....	42
3.4.	Determinación de niveles de agresividad de <i>Astyanax mexicanus</i>	43
3.4.1.	Cuantificación del nivel de agresividad.....	44
3.5.	Determinación de marcadores genéticos mediante el perfil de expresión de genes candidatos.....	46
3.5.1.	Secuencias candidatas a marcadores genéticos de conducta.....	46
3.5.2.	Extracción de RNA	46
3.5.3.	Amplificación de las secuencias genéticas de los genes candidatos por RT-PCR.....	48
3.6.	Análisis estadístico	49
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50

4.1.	Sistema de cultivo para poblaciones de <i>Astyanax mexicanus</i>	50
4.1.1.	Sistema en rack.....	50
4.1.2.	Pruebas de funcionamiento para mantenimiento	52
4.1.1.	Pruebas de funcionamiento para la inducción de reproducción	55
4.2.	Linajes de <i>Astyanax mexicanus</i>	56
4.2.1.	Captura de poblaciones silvestres	56
4.2.2.	Reproducción de poblaciones silvestres.....	58
4.3.	Determinación de niveles de agresividad de <i>Astyanax mexicanus</i>	59
4.3.1.	Cuantificación del nivel de agresividad	59
4.4.	Determinación de marcadores genéticos mediante el perfil de expresión de genes candidatos.....	64
4.4.1.	Extracción de RNA	65
4.4.2.	Amplificación de las secuencias genéticas de los genes candidatos por RT-PCR.....	66
5.	CONCLUSIÓN	70
6.	BIBLIOGRAFÍA	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1 Secuencias de primers (cebadores), temperatura de fusión (TM) y gen objetivo usados en el PCR.	47
Tabla 4-1 Calidad de agua del sistema en rack a 26°C. Promedio de 7 días ± desviación estándar, no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el filtro y el tanque de cultivo.	53
Tabla 4-2 Calidad de agua del sistema en rack a 22°C. Promedio de 7 días ± desviación estándar, no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el filtro y el tanque de cultivo.	54
Tabla 4-3 Parámetros ambientales registrados al momento de la exploración o captura.	58
Tabla 4-4 Concentración del RNA extraído de las muestras de 3 peces de superficie con agresividad alta (PSA), 3 peces de superficie con agresividad media (PSM) y 3 peces de cueva no agresivos (PCN).	66
Tabla 4-5 Perfil de expresión de genes candidatos para el comportamiento de agresividad en peces de superficie con agresividad alta (PSA), peces de superficie con agresividad media (PSM) y peces de cueva no agresivos (PCN). Se muestra la expresión relativa respecto al organismo con mayor expresión para cada gen candidato y su correlación.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 (A) Pez de superficie <i>Astyanax</i> y algunas de sus poblaciones de cuevas (B) Representación esquemática de la región de la sierra del Abra mostrando posiciones aproximadas de las cuevas. Modificado de (Jeffery 2008).....	2
Figura 1-2 Producción acuícola basada en la frecuencia de stocks mejorados genéticamente con una ganancia genética del 5.4% por año (ganancia genética del 12.5% por generación/ intervalo de generación de 2.3 años) Tomado de (Gjedrem <i>et al.</i> , 2012).	4
Figura 2-1 Representación esquemática de la neurotransmisión serotoninérgica dependiente de los niveles de serotonina (5-HT) presentes en el espacio extracelular o en la membrana celular. Se presenta la síntesis, liberación, degradación y reabsorción de la serotonina. Tomado de (Charnay y Léger 2010).....	15
Figura 2-2 (A) Poblaciones de cueva en la región de la Huasteca. Los círculos rojos corresponden a la colonización antigua. (B) Distribución de las poblaciones de superficie, considerando <i>A. mexicanus</i> y <i>A. aeneus</i> . Sierra de Guatemala: 1= cueva Molino, 2=río Guayalejo, 3= cueva Caballo Moro, 4= río El Limón, 5= Nacimiento del Río Mante; Sierra de El Abra: 6= Pachón, 7= presa Mante, 8= Yerbaníz, 9= Sabinos, 10= Tinaja, 11= Piedras, 12= Curva, 13= Chica, 14= Pte. La Raya; Micos: 15= cueva Micos cave; Linajes antiguos de superficie 16=Rascon, 17=Tamasopo. Modificado de Ornelas-García (2016).....	25
Figura 2-3 Ejemplo de relaciones filogenéticas en Teleósteos incluyendo <i>A. mexicanus</i> . Modificado de (Ulloa <i>et al.</i> , 2011).	28
Figura 2-4 Fenotipos híbridos de <i>Astyanax mexicanus</i> presentes en la cueva del Subterráneo. 24 individuos capturados mediante red. Tomado de (Jonathan Bibliowicz <i>et al.</i> , 2013).	29
Figura 3-1 Diagrama general de las actividades realizadas durante el trabajo experimental.	35

Figura 3-2 Representación esquemática del sistema de cultivo en rack. 1, Tanques de cultivo; 2, Entrada de agua; 3, Salida de agua; 4, Sistema de filtración; 5, Filtración mecánica (esponja); 6, Filtración biológica (cerámica); 7, Filtración química (carbón activado); 8, Lampara UV; 9, Termostato; 10, chiller.	37
Figura 3-3 Representación esquemática de los tanques modulares del sistema en rack. El número de salidas de agua depende del tamaño del tanque.	38
Figura 3-4 Representación esquemática de la conexión de los tanques al desagüe del sistema (A) y la entrada de agua (B).....	38
Figura 3-5 Representación esquemática de la prueba de residente-intruso (A) y la prueba de conducta gregaria (B).....	45
Figura 4-1 Sistema en rack con cubierta para establecer fotoperiodo.	51
Figura 4-2 Sistema de entrada de agua. Bomba de agua (A), válvula de llegada a tanque (B) y salida con conexión de manguera (C).....	51
Figura 4-3 Sistema de salida de agua. Conexión tanque-tubería de desagüe (A), tubería del rebosadero dentro del tanque (B), tubería de desagüe con perforaciones (C) y Salida al sistema de filtración (D).....	52
Figura 4-4 Tanque de filtración del sistema en rack.	52
Figura 4-5 Patrón de temperatura promedio del agua durante un ciclo de 24 horas en el filtro y un tanque de cultivo a una temperatura de 26°C (A) y 22 °C (B). No existe diferencia ($p > 0.05$) entre los tanques a una misma temperatura.	55
Figura 4-6 Patrón de temperaturas promedio durante un ciclo de 24 horas para el filtro y un tanque de cultivo durante la disminución (A) y el aumento (B) de temperatura a lo largo de una noche. No existió diferencia ($p>0.05$) entre los tanques.	56
Figura 4-7 Mapa de la ubicación aproximada, en la zona de la Sierra del Abra San Luis Potosí, de las cuevas de Chica (A), Micos (B) y Sabinos (C).	57
Figura 4-8 Porcentaje de desove presentado en peces de superficie (PS) y peces de cueva (PC) posterior a la inducción por temperatura. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 inducciones de temperatura de 10 parejas. * indica diferencia estadística significativa ($p<0.05$).	59

Figura 4-9 Número de ataques por minuto de 3 peces de superficie (PS) y 3 Peces de cueva (PC). Se muestra el promedio y su desviación estándar. a, b, c y d marcan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).	60
Figura 4-10 Número de ataques por minuto en poblaciones de cueva (PC) y de superficie (PS) de <i>Astyanax mexicanus</i> . Se muestra el promedio y desviación estándar de $n=10$ para PC Y PS. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).	61
Figura 4-11 Proporción de tiempo gastado en cardumen para 3 peces de superficie (PS) y 3 Peces de cueva (PC). Se muestra el promedio y su desviación estándar. No existe una diferencia significativa entre individuos de la misma población ($p > 0.05$). Existe diferencia significativa entre PC y PS ($p < 0.05$).	62
Figura 4-12 Proporción del tiempo gastado en cardumen en poblaciones de cueva (PC) y de superficie (PS) de <i>Astyanax mexicanus</i> . Se muestra el promedio y desviación estándar de $n=10$ para PC Y PS. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).....	62
Figura 4-13 Proporción de la distancia al vecino más cercano para 3 peces de superficie (PS) y 3 Peces de cueva (PC). Se muestra el promedio y su desviación estándar. No existe una diferencia significativa entre individuos de la misma población ($p > 0.05$). Existe diferencia significativa entre PC y PS ($p < 0.05$).	63
Figura 4-14 Proporción de la distancia al vecino más cercano en poblaciones de cueva (PC) y de superficie (PS) de <i>Astyanax mexicanus</i> . Se muestra el promedio y desviación estándar de $n=10$ para PC Y PS. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).....	64
Figura 4-15 Número de ataques por minuto de 3 peces de superficie con agresividad alta (PSA), 3 peces de superficie con agresividad media (PSM) y 3 peces de cueva no agresivos (PCN). Se muestra el promedio y su desviación estándar. a, b y c marcan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).	65

Figura 4-16 Porcentaje relativo de expresión de los genes candidatos seleccionados en peces de superficie con agresividad alta (PSA), peces de superficie con agresividad media (PSM) y peces de cueva no agresivos (PCN). 68

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes

Los marcadores en biología se refieren a un conjunto de señales reproducibles que se miden y evalúan objetivamente como indicadores de procesos biológicos normales, patogénicos o de respuesta a tratamientos (Lippi y Plebani 2013). Estos marcadores abarcan desde cambios moleculares y respuestas fisiológicas, hasta modificaciones del comportamiento de un organismo de interés (Strimbu y Tavel 2010). En la acuicultura se utilizan para seleccionar organismos reproductores con características que aumenten la producción, como son una mayor ganancia en peso, resistencia a enfermedades y conductas benéficas (Timmons *et al.*, 2010). La implementación de un programa de selección acuícola puede incrementar la productividad entre 6 y 14% por generación (Fernández *et al.*, 2014; Gjedrem y Robinson, 2014). Las cualidades buscadas se relacionan indirectamente con la expresión genética, por lo que actualmente se ha remarcado la importancia de investigar marcadores genéticos para identificarlas (Dunham, 2011; Yue, 2014; Wakchaure *et al.*, 2015). Los marcadores genéticos son conjuntos de genes que contribuyen a la aparición de una característica de interés en los organismos, los cuales pueden reducir los tiempos para seleccionar reproductores en un programa de reproducción (Lillehammer *et al.*, 2013; Gjedrem y Robinson, 2014).

La selección asistida por marcadores genéticos aún se encuentra en desarrollo para la acuicultura, enfocándose en determinar las características de interés que no podrían ser consideradas de otra forma, como son resistencia a enfermedades o conductas favorables para el cultivo (Bovenkerk y Meijboom 2013; Stock y Reents 2013; Odegård y Meuwissen 2014). Se resalta la importancia de identificar conductas que favorezcan la productividad del cultivo, como es el caso de la reducción de la agresividad, ya que una alta agresividad puede generar pérdidas durante algunas etapas del cultivo (Hashimoto *et al.*, 2014).

La búsqueda de marcadores adecuados para la selección asistida requiere, para disminuir los tiempos de investigación, el uso de modelos animales con

regiones conservadas de su genoma a través de los principales productos acuícolas (Ribas y Piferrer 2014). El modelo de estudio más utilizado con este fin es el pez Cebra (*Danio rerio*), el cual no puede otorgar la totalidad de información necesaria (Schartl 2014). En la última década se han considerado otros organismos como modelos de estudio, que como indica Albertson *et al.*, (2009) adquirieron durante su evolución fenotipos relacionados o muy parecidos a las características que se desean estudiar. Un modelo acuático que ha tomado importancia es el pez ciego (*Astyanax mexicanus*) que se ha utilizado en la investigación de la degeneración de retina, de problemas de pigmentación y en desordenes de sueño, entre otros estudios (Protas y Jeffery 2012). *A. mexicanus* posee fenotipos de vida en superficie y varias formas de vida en cuevas (pez troglodita) (Figura 1-1). Los peces trogloditas son nativos a las cuevas calizas de la región de la Sierra de El Abra al noroeste de México presentando 29 poblaciones. Poseen la capacidad de hibridarse con sus parientes de superficie, incrementando aún más su valor como modelo de estudio ya que permite observar un mayor número de fenotipos (Protas y Jeffery 2012).

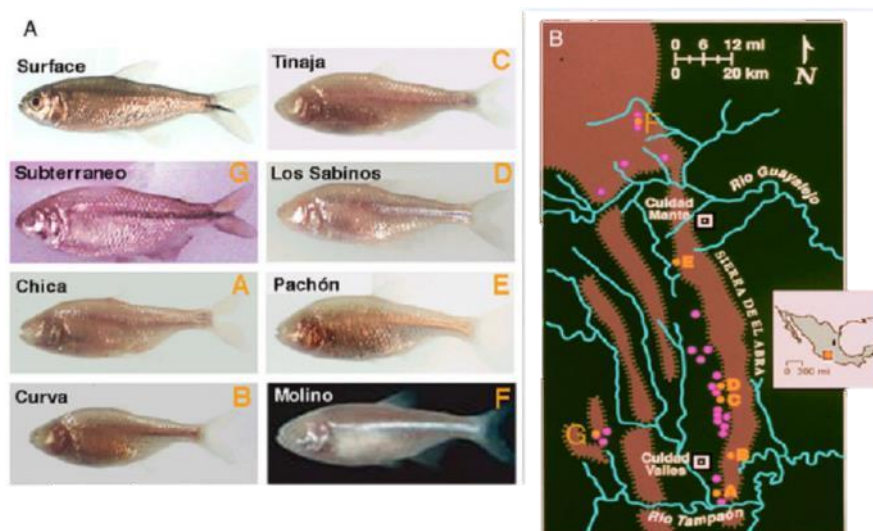


Figura 1-1 (A) Pez de superficie *Astyanax* y algunas de sus poblaciones de cuevas (B) Representación esquemática de la región de la sierra del Abra mostrando posiciones aproximadas de las cuevas. Modificado de (Jeffery 2008).

Estas poblaciones de cuevas han perdido su vista y pigmentación en diferentes grados a lo largo de su evolución paralela (Gross 2012), a la vez que han ganado otras características menos obvias como son variaciones de su

comportamiento, en donde las conductas de agresividad y formación de grupos se ven modificadas independientemente de su ambiente y características fisiológicas (Elipot *et al.*, 2013; Johanna E. Kowalko *et al.*, 2013). Se destaca que la diferencia entre la conducta de las poblaciones de superficie y de cuevas se explica en parte por una mutación en la secuencia codificante de la enzima mono amina oxidasa de las poblaciones de cueva, lo que genera altos niveles de serotonina, dopamina y noradrenalina (Elipot *et al.*, 2014a). Sin embargo, no se han realizado estudios en donde se busque un perfil genético que pudiera servir para identificar diferentes grados de agresividad, a partir de la presencia o ausencia de algún grupo de genes expresados.

1.2. Descripción del problema

Los productos acuícolas se consideran una fuente saludable de proteína animal de calidad y año con año aumenta su demanda a nivel mundial, se calcula que para el 2030 el consumo se incrementará en más de un 25% (FAO 2016). Para lograr cubrir la futura demanda de productos acuícolas es necesario implementar métodos de selección de características deseables para el aumento de la producción (Gjedrem *et al.*, 2012). La implementación de un programa de reproducción acuícola puede incrementar la productividad entre 6 y 14% por generación (Gjedrem y Thodesen, 2005; Fernández *et al.*, 2014). Con la actual proporción del 8% de productores que aplican programas de selección, a nivel mundial, se estima que para el 2020 la producción acuícola alcanzaría los 53.2 millones de toneladas, pero si la proporción de selección fuera del 75% se podría llegar a generar más de 80 millones de toneladas (Figura 1-2) (Gjedrem y Robinson 2014).

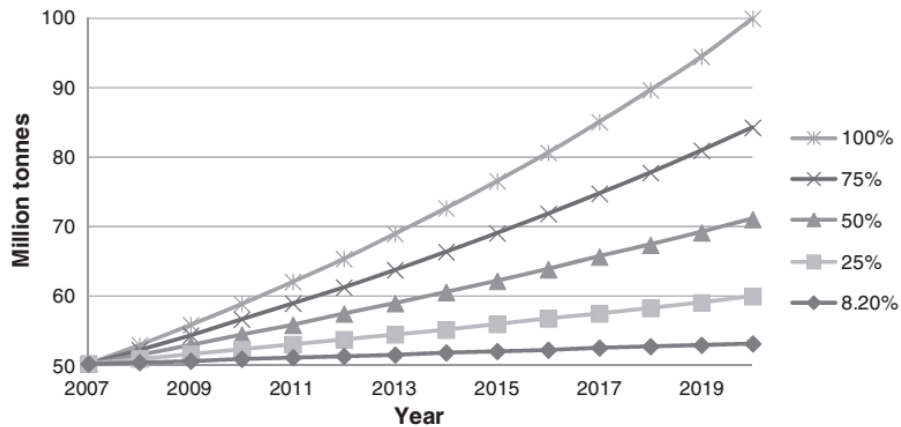


Figura 1-2 Producción acuícola basada en la frecuencia de stocks mejorados genéticamente con una ganancia genética del 5.4% por año (ganancia genética del 12.5% por generación/ intervalo de generación de 2.3 años) Tomado de (Gjedrem *et al.*, 2012).

El tiempo promedio para seleccionar reproductores, esperando que adquieran su madurez, es de 2.3 años, siendo esto el principal factor que limita la implementación de programas de selección acuícola (Gjedrem *et al.*, 2012). Estos tiempos de selección implican la necesidad de una amplia infraestructura dedicada a la búsqueda de reproductores dentro de la granja de cultivo, generando un gasto que los productores no están dispuestos a cubrir. Estos tiempos se podrían disminuir utilizando marcadores genéticos para identificar, en las etapas iniciales de desarrollo, a los organismos de interés (Lillehammer *et al.*, 2013; Gjedrem y Robinson, 2014).

La búsqueda de marcadores adecuados para la selección asistida requiere, para disminuir los tiempos de investigación, el uso de modelos animales con regiones conservadas de su genoma a través de los principales productos acuícolas (Ribas y Piferrer 2014). Actualmente no existe un modelo de estudio enfocado a buscar marcadores de conducta en la acuicultura, por lo que las características diferenciales entre poblaciones de *A. mexicanus* otorga oportunidades para su uso.

A pesar del alto potencial que presenta *A. mexicanus* como modelo de estudio no existen reportes de las características diferenciales de los linajes trogloditas más allá de su relación filogenética (Coghill *et al.*, 2014). La especie cuentan con muy poca información sobre su mantenimiento adecuado en cultivo (Elipot *et al.*, 2014a).

1.3. Justificación

La investigación de marcadores genéticos en las distintas especies de interés acuícola aún se encuentra en desarrollo, enfocándose en características de interés que no podrían ser encontradas de otra forma, como son las diferencias en la agresividad (Odegård y Meuwissen, 2014; Cañon Jones *et al.*, 2016). Actualmente la tendencia es la búsqueda del bienestar del cultivo, por lo que el incremento de conductas gregarias con una menor agresividad podrían mejorar el bienestar general del cultivo, permitiendo la domesticación de especies en un menor tiempo (Bovenkerk y Meijboom, 2013; Lillehammer *et al.*, 2013).

El pez ciego nativo de la sierra de San Luis potosí *Astyanax mexicanus* presenta oportunidades de investigación gracias a sus diferentes fenotipos creados a lo largo de su evolución paralela (Gross 2012), en donde las conductas de agresividad y formación de grupos se ven modificadas independientemente de su ambiente y características fisiológicas (Espinasa *et al.*, 2005; Johanna E. Kowalko *et al.*, 2013), generando la oportunidad de identificar marcadores genéticos relacionados con estas conductas mediante una comparación directa de su expresión, ya que comparten la mayor parte de su genoma (Coghill *et al.*, 2014). En caso de identificar marcadores adecuados estos podrían ser utilizados en investigaciones posteriores para realizar estudios puntuales en otras especies de interés comercial,.

Actualmente no existe en México un centro que cuente con un stock para la investigación de esta especie, por lo que la gran cantidad de estudios extranjeros que se realizan sobre la misma son realizados a partir de organismos capturados o de laboratorios donde se mantienen bajo condiciones muy diferentes a las naturales (Borowsky 2008a). Para estudiar las características diferenciales que presenta *A. mexicanus* es esencial la obtención y mantenimiento de la especie considerando el control de las condiciones ambientales, ya que estas afectan el desarrollo genético de los individuos y su comportamiento (Christie *et al.*, 2012; Gallo y Jeffery, 2012; Beale *et al.*, 2013; Villamizar *et al.*, 2014), por lo que en este trabajo se propone la elaboración de un sistema de cultivo adecuado para el crecimiento y reproducción de *A. mexicanus* para, por una parte, comenzar con una biblioteca biológica de la

especie, a la par que se generan linajes específicos para realizar estudios relacionados con la detección de marcadores genéticos.

1.4. Hipótesis

La expresión diferencial de genes en poblaciones de *A. mexicanus*, permite identificar marcadores genéticos relacionados con la conducta de agresividad.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Determinar marcadores genéticos relacionados con el nivel de agresividad de *Astyanax mexicanus*.

1.5.2. Objetivos particulares

1. Implementar un sistema de cultivo para proporcionar las condiciones adecuadas a las diferentes poblaciones de *Astyanax mexicanus*
2. Obtener organismos con diferentes niveles de agresividad para su uso como modelos de estudio.
3. Caracterizar genéticamente los linajes seleccionados mediante marcadores genéticos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Sistema acuícola

El cultivo y crianza de plantas y animales acuáticos en un ambiente completamente controlado o semi-controlado se denomina acuicultura, donde “cultivo” se refiere al objetivo de llevar a los organismos a su estado juvenil o adulto bajo condiciones de cautiverio (Connolly y Trebic, 2010; Timmons *et al.*, 2010). Esta actividad no es nueva, el cultivo de peces está documentado desde el año 2500 A.C., cuando los egipcios la realizaban en el delta del Nilo, de igual forma, los chinos la practicaban desde el 500 A.C. cultivando carpas, mientras que los romanos manejaban estanques para el cultivo de organismos acuáticos (Borgese 1980).

La acuicultura puede realizarse a diferentes niveles de escala e intensidad, desde la maricultura, donde los organismos son cultivados en ambientes marinos protegidos en amplias extensiones, o la acuicultura de traspatio, donde la producción es únicamente para autoconsumo (Connolly y Trebic 2010). Sin importar la escala de producción, un sistema de cultivo acuícola requiere de la regulación de las condiciones ambientales para permitir el correcto desarrollo del organismo de interés. Entre los parámetros que deben ser regulados se encuentran la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, el amoníaco, la dureza y en algunos casos el fotoperiodo (Soto-Zarazúa *et al.*, 2014), como se explica a continuación:

Temperatura. Es uno de los parámetros físicos más importantes ya que tiene un efecto directo sobre los sistemas biológicos, que sumado al hecho de que los peces son animales poiquiloterms, genera la necesidad de mantener un rango muy estrecho en el control de este parámetro (Lawrence 2007). Un aumento en la temperatura genera un incremento en el gasto metabólico y por lo tanto un mayor requerimiento energético, mientras que una disminución puede impedir el desarrollo de los organismos, por lo que la implementación de un método de calefacción es esencial. Esta regulación se puede lograr a través del calentamiento del agua de forma directa o indirecta. El calentamiento puede realizarse con serpentines metálicos calientes o con algún otro proceso (Timmons *et al.*, 2010). En los sistemas de cultivo para investigación generalmente se utiliza la misma técnica que en los acuarios comerciales, modificando la temperatura a través del uso de termostatos

eléctricos(Lawrence y Mason 2012). Se destaca que un inadecuado control de la temperatura es potencialmente una causa de mortandad en el sistema.

Oxígeno disuelto. Es un factor crítico en un cultivo acuícola, los valores bajos de este son la principal causa de mortandad en la acuicultura. Los peces requieren el oxígeno para su respiración y su demanda depende de un gran número de factores como son el tamaño del organismo, la cantidad de alimento suministrado, los niveles de actividad y la temperatura. En general se recomienda mantener este parámetro cercano a su saturación en el agua, por lo que se utilizan sopladores o inyectoros de oxígeno para elevar el intercambio gaseoso en el agua. Una variación alta de esta condición genera la muerte de los organismos, pero aún pequeñas desviaciones del óptimo requerido por la especie son causa de estrés y por ende una reducción en el crecimiento y reproducción de la misma (Timmons *et al.*, 2010; Lawrence y Mason, 2012).

Potencial de Hidrogeno (pH). Este Juega un papel importante en cualquier sistema acuático, ya que además de participar en los procesos metabólicos de la especie de interés también facilita la formación de comunidades microbianas que favorezcan la salud de los organismos (Lawrence y Mason 2012). Para el control de esta variable se recomienda cuidar el origen del agua a utilizar o en su caso utilizar resinas adecuadas en un filtro mecánico para modificar sus valores, un mal control del pH genera estrés sobre los organismos, causando daños fisiológicos sobre el mismo y por otra parte puede generar que otros compuestos, como los nitrogenados, formen moléculas altamente tóxicas para los animales acuáticos (Timmons *et al.*, 2010).

Amoniaco. Los compuestos nitrogenados y en especial el amoniaco forman parte de las excreciones de los peces y también son producidos a partir de la descomposición de materia orgánica presente en el sistema (Wikie 2002). La toxicidad de los compuestos nitrogenados varía junto con la temperatura y el pH, ya que el amoniaco se encuentra en equilibrio con el amonio, donde el primero es mucho más tóxico que el segundo (Timmons *et al.*, 2010). Es necesario eliminar estos compuestos lo más rápido posible en un sistema acuícola cerrado, tarea que se logra gracias a la participación de las bacterias nitrificantes que oxidan el amoniaco y el amonio transformándolo a nitratos no tóxicos. Este proceso se lleva

a cabo mediante la implementación de un filtro biológico en el sistema, en caso de no controlar este compuesto en la mayoría de las especies concentraciones superiores a las 0.02 mg/L generan estrés sobre los organismos, disminuyendo su producción. Valores superiores a 1 mg/L pueden ser letales (Gutierrez-Wing y Malone 2006).

Dureza. La dureza se refiere a la cantidad de iones divalentes como pueden ser calcio, magnesio, hierro y selenio en el agua (Wurts 2002). Los peces requieren estos nutrientes para su correcta nutrición, pero el más importante es el calcio, ya que es requerido para la osificación y otras reacciones metabólicas. Generalmente no se considera su control en la producción acuícola, ya que puede ser modificado por los métodos para regular el pH (Lawrence 2007). En caso de ser necesario, la dureza puede ser regulada siguiendo una buena planeación de regulación de pH utilizando materiales adecuados de filtración química (Timmons *et al.*, 2010).

Fotoperiodo. El fotoperiodo no es un factor que normalmente se regule en los sistemas acuícolas, pero considerando su efecto sobre los organismos, especialmente en el comportamiento de los mismos (Beale *et al.*, 2013), que es parte de los objetivos de esta investigación, es necesario controlarlo. Esto se puede lograr mediante la implementación de sistemas de iluminación automatizados como los reportados por Aguirre-Becerra (2013), donde se utilizaron satisfactoriamente luces led para simular diferentes fotoperiodos.

2.2. Comportamiento de los peces

2.2.1. Importancia del comportamiento de los peces en la acuicultura

El comportamiento es la acción o serie de acciones que realiza un organismo en respuesta a un estímulo externo o interno (Huntingford *et al.*, 2012d). Cada una de estas respuestas esta mediada por una gran diversidad de factores, incluyendo las condiciones ambientales donde se encuentra el organismo y un conjunto de genes que interactuando entre si modifican los neurotransmisores y hormonas para generar la regulación de circuitos neuronales que causan un comportamiento, que en muchos casos están conservados entre vertebrados (O'Connell y Hofmann 2012). En los peces estos comportamiento tendrán un efecto

en las condiciones fisiológicas del organismo, por lo que pueden ser útiles como indicadores de la salud de un cultivo acuícola, afectando la productividad del mismo (Bell *et al.*, 2007; Huntingford *et al.*, 2012c; Martins *et al.*, 2012). Adicionalmente el bienestar de los organismos está tomando una mayor importancia en los cultivos acuícolas, ya que los consumidores están solicitando mejores condiciones durante el manejo de los animales, y se debe considerar que las respuestas conductuales tienen una gran importancia durante el mejoramiento del bienestar general del cultivo (Bovenkerk y Meijboom 2013; Grimsrud *et al.*, 2013; Huntingford y Kadri 2014; Ellingsen *et al.*, 2015). Por otra parte, la tendencia actual en la acuicultura es la búsqueda y domesticación de nuevas especies para llevar a cultivo (Peña-Herrejón *et al.*, 2016). Durante la domesticación de organismos silvestres la conducta se modifica durante los primeros ciclos de cultivo en cautiverio generando la reducción del miedo hacia los humanos, la disminución en los comportamientos anti depredadores, un menor interés en la búsqueda de alimento, así como modificaciones en su comportamiento reproductivo y sus niveles de agresividad (Teletchea y Fontaine 2014). La selección genética de organismos para el mejoramiento de líneas de cultivo acuícola ha generado la creación de “síndromes” o conjuntos de comportamientos que presentan los individuos en cultivo, que no siempre son benéficos para la productividad o el bienestar de los organismos, por lo que debería de ser un punto importante a considerar al momento de realizar la selección de reproductores (Huntingford y Adams 2005).

Existen múltiples comportamientos de importancia para la acuicultura, pero los siguientes podrían tener un efecto directo sobre la productividad del cultivo: Movimiento y orientación. Afecta el espacio que utiliza un organismo dentro del sistema de cultivo (Huntingford *et al.*, 2012b).

- Búsqueda de alimento. Tiempo que dedican al consumo de alimento y por tanto a la producción de biomasa (Jobling *et al.*, 2012a).
- Selección de dieta. Tipo de alimento que consume una población determinada de alguna especie dependiendo de sus condiciones ambientales (Raubenheimer *et al.*, 2012).

- **Apetito y cantidad de alimento consumido.** Conducta que modifica los tiempos requeridos para crecimiento, así como la cantidad de insumos requeridos en un tiempo determinado (Jobling *et al.*, 2012b).
- **Movimiento y orientación.** Afecta el espacio utilizado por un organismo dentro del sistema de cultivo (Huntingford *et al.*, 2012b).
- **Conductas para evitar depredadores.** Estas conductas aumentan el estrés de los organismos, representando un gasto energético innecesario en la acuicultura, pero pueden ser requeridas en la producción para conservación (Huntingford *et al.*, 2012a).
- **Agresividad.** Conducta que causa un daño a otro animal, permitiendo el ataque de microorganismos que pueden llegar a generar enfermedades en el cultivo, mermando así la producción, además de causar un gasto energético no requerido para la producción (Damsgård y Huntingford 2012).
- **Comportamiento reproductivo.** Requerido para lograr una correcta producción de semilla para la siembra de un cultivo acuícola (Fleming y Huntingford 2012).

La acuicultura requiere enfocarse en la búsqueda de conductas que favorezcan la productividad, tal como la disminución de la agresividad, ya que esta conducta puede generar pérdidas en algunas de las etapas del cultivo (Hashimoto *et al.*, 2014).

2.2.2. Conducta de agresividad en la acuicultura

Las conductas agresivas en los peces se presentan generalmente en forma de actitudes de territorialidad, cuando un pez se establece en una zona del estanque y lo defiende, así como de actitudes de dominancia, generando peleas entre los organismos por determinar una jerarquía, estableciendo un pez dominante y múltiples subordinados (Alcazar *et al.*, 2014). El nivel de agresividad de un cultivo piscícola modifica el tiempo de crecimiento de un organismo, lo que afecta la homogeneidad final del producto (E. Barnes, 2011; Batzina *et al.*, 2014). Esto provoca que se requieran un mayor número de cribados, extendiendo el tiempo y costo para llegar a la talla comercial. La agresividad también puede generar pérdidas a partir de las heridas que se generan en los contactos entre organismos, ya que por lo general el pez que perdió la pelea se encontrará en un mal estado, lo

que causa una disminución en sus defensas naturales y permite el acceso de microorganismos dañinos a sus tejidos (Huntingford y Kadri 2014). Esto puede causar el brote de una enfermedad, que debido a las altas densidades dentro de los cultivos acuícolas, fácilmente podría diseminarse y causar la muerte de un gran número de organismos, aunque estos no hayan participado directamente en la conducta agresiva.

Dentro de las granjas de producción piscícola los organismos se mantienen normalmente en grupos de individuos con tallas similares, con el fin de obtener una producción más homogénea al final del periodo de cultivo (Timmons *et al.*, 2010; Garcia Trejo *et al.*, 2016). Los organismos con tamaños similares tienden a presentar una habilidad de “combate” similar, lo que incrementa las interacciones agresivas para el establecimiento de rangos sociales, causando más lesiones corporales como consecuencia, lo que reduce el bienestar del cultivo a su vez que aumenta el estrés de los organismos (Barreto *et al.*, 2015). Un incremento en el nivel de estrés se reflejará en una disminución en la productividad final del cultivo (Portz *et al.*, 2006).

El comportamiento de agresividad se ha reportado como un posible indicador del nivel de estrés del cultivo, relacionándose directamente el número de ataques con el nivel fisiológico de estrés (Barreto *et al.*, 2009). El nivel de agresividad se ve afectado también por el nivel de estrés en el que se encuentre el organismo. Bajo diferentes fuentes de estrés (cambios en la salinidad, aumento de la intensidad lumínica, cambios en la temperatura del agua, disminución del nivel del agua y el aumento de las densidades de cultivo) se observó un aumento de la agresividad en especies como la tilapia *Oreochromis niloticus*, los cíclidos *Herichthys cyanoguttatus* y *Geophagus proximus* o el modelo de investigación del pez cebra (*Danio rerio*) (Carvalho *et al.*, 2013; Lorenz *et al.*, 2016; Rambo *et al.*, 2016). En el cerebro el control de los efectos del estrés está relacionado con el sistema de la serotonina, incluyendo el control de la agresividad mediada por cortisol, ampliamente conservado entre los vertebrados (Damsgård y Huntingford 2012). Niveles elevados de serotonina inhiben la agresividad (Elipot *et al.*, 2014a; Niederkofler *et al.*, 2016), causando diferencias en la actividad cerebral que contribuyen a la diferenciación individual de la agresividad entre especies y dentro

de la misma especie. Por lo que se ha propuesto que uno de los principales factores que determinan la agresividad de un pez es la cantidad de serotonina que está expresando, mediada por diferentes factores, incluyendo la expresión genética (Höglund *et al.*, 2005; Elipot *et al.*, 2013; Elipot *et al.*, 2014a).

2.2.3. Conducta de agresividad y neurotransmisores

Los neurotransmisores son moléculas de señalización en el sistema nervioso. Su función depende de receptores específicos a cada neurotransmisor en la hendidura sináptica. Múltiples redes neuronales se han asociado con el comportamiento de agresividad y se han estudiado en diferentes especies como reptiles, gatos, aves, ratones, ratas, humanos y peces (Narvaes y Martins de Almeida 2014), pero aún no se determina el mecanismo exacto de la agresividad (Jager *et al.*, 2018). Entre los neurotransmisores asociados a la agresividad se enfatiza la participación de la dopamina (3-hidroxitiramina), el GABA (ácido γ -aminobutírico) y la serotonina (5-hidroxitriptófano, 5-HT) (Martins de Almeida *et al.*, 2005; Jager *et al.*, 2018), destacando que en las últimas décadas ha tenido una mayor aceptación el reconocimiento de la serotonina como el neurotransmisor clave en el comportamiento de agresividad en múltiples modelos animales, incluyendo el ser humano (Narvaes y Martins de Almeida 2014; Theodoridi *et al.*, 2017; Naji *et al.*, 2017; Backström y Winberg 2017).

El sistema de la serotoninérgico es altamente conservado entre vertebrados (Lillesaar 2011; Swallow *et al.*, 2016). La serotonina pertenece al grupo de las monoaminas y es producida por las neuronas en los núcleos del rafe. Su acción sobre el comportamiento es muy compleja ya que puede actuar sobre una gran diversidad de receptores (Oers y Sinn 2013). Además de los efectos directos de la serotonina sobre el comportamiento, esta actúa sobre otros sistemas neuroquímicos, que participan en funciones fisiológicas (alimentación, recompensa, termorregulación, regulación cardiovascular, locomoción, el ciclo de sueño, memoria, reproducción, respuesta a estrés, agresividad y otros comportamientos) (Charnay y Léger 2010), lo que coloca al sistema serotoninérgico sobre todos los demás sistemas que participan en la modulación del comportamiento (de Boer *et al.*, 2015). La serotonina se presenta desde las etapas de embriogénesis y juega un

papel importante en la morfogénesis y en el tráfico neuronal (Buznikov *et al.*, 2001; Guo 2009).

El sistema serotoninérgico incluye múltiples procesos: la síntesis de la serotonina, la liberación de serotonina, la función de los receptores de serotonina y la degradación y reabsorción de la serotonina. En el cerebro la subpoblación de neuronas tienen un conjunto de enzimas que permiten la síntesis en dos pasos de la serotonina desde su precursor triptófano (Silber y Schmitt 2010), comenzando con la triptófano hidroxilasa 1 (TPOH1) y la triptófano hidroxilasa 2 (TPOH2), que debido a su 30% de secuencia heteróloga puede tener un control selectivo (Matthes *et al.*, 2010). Posterior a la reacción limitante mediada por TPOH1 y TPOH2 la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) permite llevar el triptófano a serotonina (Manegold *et al.*, 2009). Ya se han reportado polimorfismos en TPOH1 y 2 así como mutaciones puntuales en AADC con efectos sobre las funciones neuronales (Galfalvy *et al.*, 2009; Manegold *et al.*, 2009; Saetre *et al.*, 2010).

El efecto de la serotonina es mediado por el transportador de serotonina (SERT) cuya función es la recaptura de la serotonina liberada en el espacio celular, y por lo tanto el control de la duración y magnitud de la neurotransmisión mediante receptores de serotonina (Charnay y Léger 2010). Se han asociado múltiples polimorfismos de SERT a trastornos neuronales (Steiner *et al.*, 2008; Nordquist y Orelund 2010). Posterior a la recaptura mediada por SERT, la serotonina puede ser degradada mediante la monoamina oxidasa (MAO) asociada a las membranas mitocondriales (Charnay y Léger 2010). En el sistema nervioso la serotonina es metabolizada o degradada principalmente por la monoamina oxidasa A (MAOA) y se reporta una vida media de la serotonina de solo unos pocos minutos (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Por esta razón parecería difícil el movimiento de la serotonina fuera del cerebro, aunque se ha observado serotonina proveniente del cerebro en el torrente sanguíneo de algunas especies de ratas (Nakatani *et al.*, 2008). La serotonina también puede llegar a ser empacada, en lugar de degradada, en vesículas por un transportador molecular dependiente de H⁺, el transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2). VMAT2 participa en procesos de acumulación de serotonina que posteriormente pueden liberarse al espacio extracelular (Omote y Moriyama 2013).

Durante la función de la serotonina participan los receptores a serotonina, de los cuales se han descrito 15 poblaciones incluyendo los receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇ y sus variantes (Hannon y Hoyer 2008). La mayoría de estos se encuentran tanto en el cerebro como en el tracto digestivo (Charnay y Léger 2010). Una estimulación constante de serotonina o alguna sustancia afín genera una reducción en la respuesta de los receptores 5-HT (Bhattacharyya *et al.*, 2002; Idkowiak-Baldys *et al.*, 2009). Un resumen de las interacciones del sistema serotoninérgico se puede observar en la Figura 2-1.

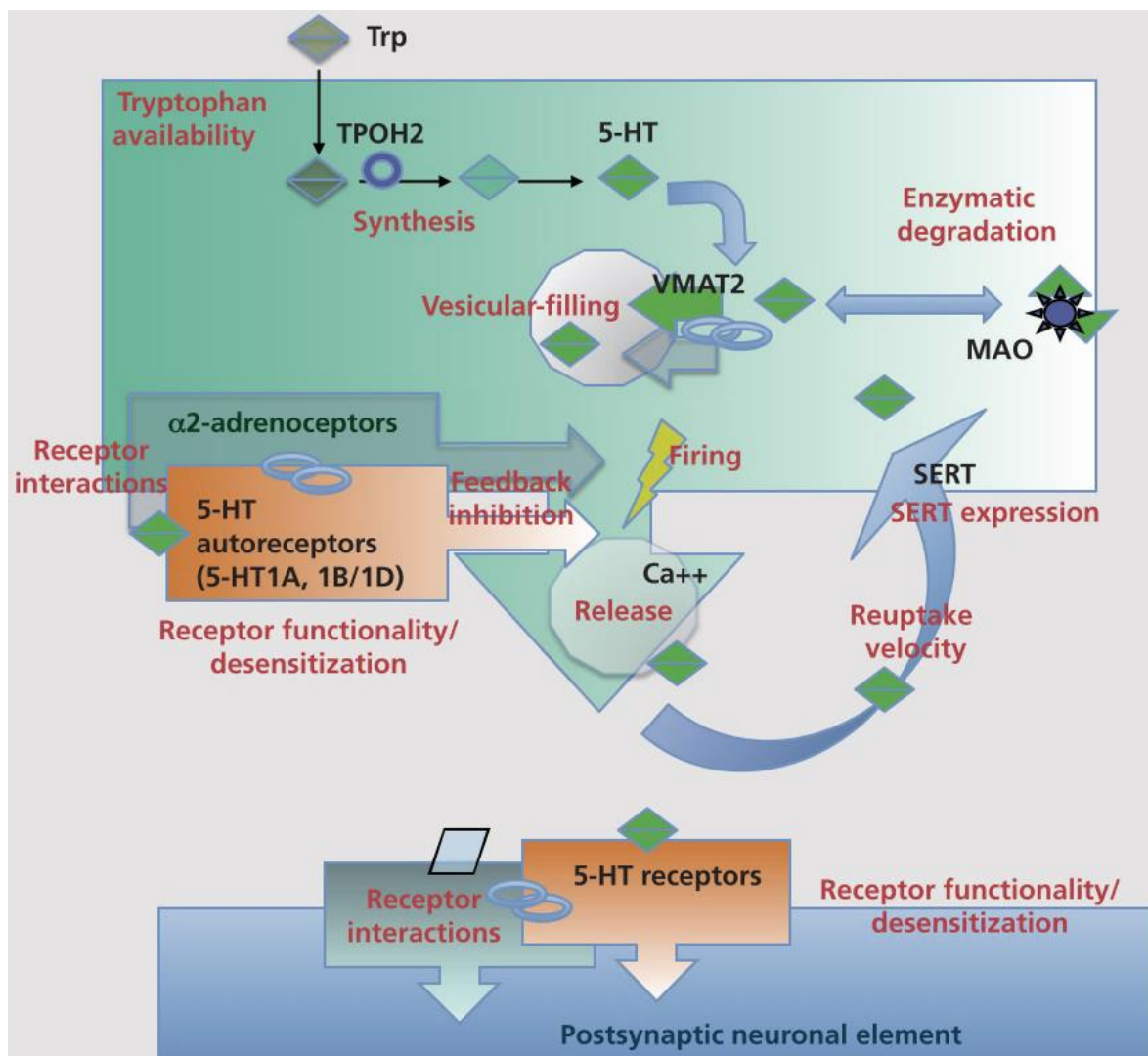


Figura 2-1 Representación esquemática de la neurotransmisión serotoninérgica dependiente de los niveles de serotonina (5-HT) presentes en el espacio extracelular o en la membrana celular. Se presenta la síntesis, liberación, degradación y reabsorción de la serotonina. Tomado de (Charnay y Léger 2010).

Los procesos involucrados en el sistema serotoninérgico han sido estudiados principalmente en mamíferos, existiendo información limitada del proceso exacto en peces teleósteos (Prasad *et al.*, 2015), aunque estos peces también conservan las moléculas involucradas (Rahman y Thomas 2009; Bortolato *et al.*, 2010; Lillesaar 2011; Herculano y Maximino 2014) . En el pez cebra se han reportado cuatro isoformas para TPH (Bellipanni *et al.*, 2002; Teraoka *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2013) , dos isoformas de SERT (Wang *et al.*, 2006; Norton *et al.*, 2008), una de MAO (zMAO) (Sallinen *et al.*, 2009) y la presencia de AADC (Yamamoto *et al.*, 2011), VMAT (Wen *et al.*, 2008) y los receptores 5HT (Wang *et al.*, 2006; Norton *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2012).

2.2.4. Cuantificación del comportamiento de agresividad

El problema de estudiar la conducta es que es un evento efímero que usualmente no deja una marca después de que se ha realizado, además de que se debe de considerar que esta acción es modificada por las circunstancias pasadas y presentes por las que se ha encontrado el organismo (Huntingford *et al.*, 2012d). El estudio del comportamiento requiere el establecimiento de variables cuantificables para la determinación de las conductas de interés.

Se ha propuesto que la conducta de agresividad se relaciona directamente con el número de ataques que presenta el organismo en contra de otros individuos dentro del mismo tanque (Elipot *et al.*, 2013a). Existen dos formas principales para llevar a cabo esta prueba, una es el uso de un oponente real para provocar los ataques (dos peces vivos) y la otra es el uso de un espejo para inducir los ataques de un individuo al ver su reflejo (Teles y Oliveira 2016).

El uso de un oponente vivo tiene la ventaja de que genera el estímulo más real en un contexto social, generando fenotipos dominantes y subordinados, pero a su vez esto causa que se presente un menor control en las condiciones experimentales, ya que el estímulo que se genere dependerá en gran medida del comportamiento del oponente, el cual puede ser más o menos dominante que el organismo de interés, por lo que con algunos oponentes será más agresivo, mientras que con otros se podría convertir en el subordinado. A su vez esta forma de cuantificar la agresividad tiene limitantes desde el punto ético ya que los

individuos se lastimarán físicamente a lo largo del experimento (Rétaux y Elipot 2013; Teles y Oliveira 2016).

La prueba del reflejo en un espejo tiene la ventaja de que el comportamiento estará estandarizado, ya que siempre será el mismo pez oponente y no se generarán heridas en los peces. Aun así este método tiene la limitante de que las peleas no llegarán a un fin y por lo tanto no existirá una victoria o derrota, además de que existen casos en que los organismos no presentan una interacción adecuada al estímulo de su reflejo, como es el caso de los peces ciegos (Rétaux y Elipot 2013; Teles y Oliveira 2016). Sin importar el método seleccionado esta conducta puede ser cuantificada mediante una grabación, realizando el conteo de los contactos que causan una rápida separación de los peces y dividiéndolo entre el tiempo total de la grabación en minutos, obteniendo de esta forma una medida del número de ataques por minuto (NAM), parámetro que puede ser utilizado para designar diferentes grados de agresividad al comparar grabaciones con la misma duración.

Generalmente los organismos menos agresivos tienden a agruparse, por lo que esta conducta facilita el cultivo (Ellen *et al.*, 2014). A ésta se le llama conducta gregaria y puede cuantificarse como una menor distancia entre organismos (Beale *et al.*, 2013; Johanna E. Kowalko *et al.*, 2013). En estudios previos se han propuesto algunos indicadores para cuantificar las conductas gregarias, entre los que destacan:

- La distancia del vecino más cercano (DVC), Distancia desde el centro del cuerpo del pez al centro del cuerpo del individuo más cercano a él (Delcourt y Poncin 2012).
- Distancia Inter-individual (DII), Distancia entre el pez y todos los otros individuos dentro de un mismo grupo (Johanna E. Kowalko *et al.*, 2013).
- Proporción del tiempo gastado en cardumen individualmente (TGC), se determina del total del tiempo de grabación cuánto se pasó en cardumen (Johanna E. Kowalko *et al.*, 2013).

Estas técnicas ya han sido probadas en *A. mexicanus*, obteniendo resultados favorables, por lo que son adecuadas para la cuantificación de la

conducta de agresividad en esta especie (Espinasa *et al.*, 2005; Elipot *et al.*, 2013; Johanna E. Kowalko *et al.*, 2013; Rétaux y Elipot, 2013).

2.3. Selección genética

La interacción genotipo-fenotipo se fundamenta en el dogma central de la biología molecular (Crick 1970). Si se quiere observar la totalidad de información que contiene el organismo se puede estudiar el DNA y si por el contrario el punto de interés son los genes que actúan sobre dicho organismo en un momento determinado se estudia el RNA. Se debe considerar que la expresión del fenotipo no está ligada sólo al genotipo, ya que pueden existir otras interacciones no genéticas que modifiquen su expresión, como son cambios en el medio ambiente (Visscher *et al.*, 2008).

La selección genética implica la búsqueda de características de interés presentes en un ser vivo para conservarlas en su descendencia, denominando a esto heredabilidad. La heredabilidad se atribuyen a la variación en un grupo de genes o el total de los valores genéticos (Visscher *et al.*, 2008). La heredabilidad de una característica está formada por parámetros poblacionales, según lo propuesto por Ellen *et al.*, (2014). El primero es el fenotipo de interés, que según el modelo de natura-nurtura está formado por una contribución no observable, el genotipo (G) y por factores ambientales (E):

$$\text{Fenotipo (P)} = \text{Genotipo (G)} + \text{Ambiente(E)} \quad (1)$$

La variación de los fenotipos observados σ_P^2 es la suma de las variaciones no observadas (σ_G^2 y σ_E^2):

$$\sigma_P^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2 \quad (2)$$

La heredabilidad está definida como una razón de varianzas, la proporción de varianzas fenotípicas que pueden atribuirse a los valores genotípicos:

$$\text{Heredabilidad (concepto amplio)} = H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2} \quad (3)$$

La varianza genética puede ser particionada en la varianza de efectos aditivos de genes (valores de reproducción σ_A^2), de efectos genéticos de dominancia

(interacción entre alelos en un mismo locus) σ_D^2 , y de efectos genéticos epistáticos (interacción entre alelos en diferentes loci) σ_I^2 :

$$\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_I^2 \quad (4)$$

$$\text{Obteniendo la Heredabilidad (concepto estricto)} = h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2} \quad (5)$$

2.3.1. Selección genética en la acuicultura

Aprovechando la capacidad de los seres vivos para heredar genes, la selección genética se refiere a escoger a los progenitores más adecuados para generar una descendencia con ciertas características objetivo. Esta selección tiene la capacidad de incrementar la productividad en la acuicultura, pero para poder obtener el resultado deseado es necesario tener un plan de reproducción bien estructurado (Theòdór y Árnasson 2014):

1. Creación de una población base donde los animales se recolecten de poblaciones silvestres.
2. La reproducción de los animales se debe conocer.
3. El objetivo de la reproducción debe ser definido.
4. La variación genética asociada con las características seleccionadas y su heredabilidad debe ser determinada.
5. Los métodos de reproducción deben ser definidos.
6. Se debe evitar la endogamia para mantener la sustentabilidad.
7. Predecir las mejoras genéticas.
8. Seguir la mejora.

Una población base es un grupo de individuos de progenitores desconocidos. Dentro de un mismo linaje se permite la reproducción libre durante la primera generación. Esto generará una mayor variedad genética que permitirá un mantenimiento de “vigor genético” a largo plazo. La selección de diferentes reproductores es la estrategia disponible más importante. La ventaja de este método es que las mejoras se realizan permanentemente y de forma acumulativa (Theòdór y Árnasson 2014).

La proporción de endogamia en las especies acuícolas puede ser muy grande debido a su tasa de reproducción, por lo que es muy importante restringir su

aparición. En un plan de reproducción normal no es posible evitar que con cada generación aumente el rango de endogamia pero es por esto que se necesita un gran número de familias independientes para incrementar la variabilidad genética (Theòdór y Árnasson 2014)

2.3.2. Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos representan diferencias entre organismos, no siempre representan al gen de interés si no que actúan como señales que se localizan cerca o ligadas al gen (Collard *et al.*, 2005). Todos los marcadores genéticos ocupan un lugar específico en el genoma dentro de los cromosomas llamado loci. Mediante el uso de marcadores de DNA es teóricamente posible utilizar la variabilidad genética de todo el genoma. Los marcadores comúnmente usados incluyen (Chauhan y Rajiv 2010):

- Marcadores de aloenzimas, determina niveles de variación dentro de una misma población mediante la variación estructural de enzimas en un mismo locus en diferente alelo.
- Marcadores de DNA mitocondrial, las divergencias genéticas se acumulan más rápidamente en el DNA mitocondrial que en DNA nuclear por lo que son útiles para clasificar relaciones familiares.
- Amplificación aleatoria de DNA polifórmico (RAPD, random amplified polymorphic DNA markers), son los productos de la amplificación de las partes menos funcionales del genoma que no responden directamente a la selección fenotípica. Estas regiones acumulan más mutaciones de DNA lo que permite diferenciar genéticamente a las poblaciones.
- Polimorfismo de nucleótido simple (Single nucleotide polymorphism, SNP), describen polimorfismos causados por mutaciones puntuales que da lugar a diferentes alelos conteniendo bases alternativas en un nucleótido determinado.
- Marcador de secuencia expresada (Expressed sequence tags, ESTs), son secuencias generadas aleatoriamente de cDNA. ESTs se utilizan para identificar genes y analizar su expresión en términos de su perfil de expresión. Este método ayuda a dar una rápida evaluación del análisis de genes

expresados en tipos específicos de tejidos, bajo condiciones fisiológicas específicas o durante una etapa determinada de desarrollo permitiendo gracias a los microarreglos de cDNA analizar la expresión diferenciada de genes en una forma sistemática.

- Marcadores de microsatélites, consisten en múltiples copias acomodadas en tándem de una secuencia simple repetida (SSRs) que va desde una a seis pares de bases. Estas son abundantes en todos los organismos estudiados hasta el momento, el único problema es que requieren la determinación de los primers para PCR.

Cuando existe suficiente información sobre la característica de interés se puede optar por un enfoque a partir de genes candidatos para el establecimiento de marcadores genéticos, en donde se plantea una hipótesis acerca de los genes que podrían tener un efecto sobre las características de interés y su correlación sobre esta característica (Tabor *et al.*, 2002; Zhu y Zhao 2007).

2.3.3. QTL (*Quantitative trait loci*)

Generalmente las características de interés no dependen de un solo gen, sino que están controladas por un conjunto de genes y factores de transcripción que interactúan para producir un fenotipo característico que caerá dentro de un espectro de posibilidades (Quinn *et al.*, 2012). Los patrones fenotípicos de interés, requiere del entendimiento del funcionamiento de las redes que regulan los genes y cómo estos están moldeados por el ambiente (García de Leaniz *et al.*, 2007).

Un loci de características cuantitativas (*Quantitative trait loci*, QTL) permite identificar genes asociados a características complejas (Quinn *et al.*, 2012). Son regiones del genoma que contienen o están ligadas a genes que contribuyen a una característica determinada. Esta asociación se determina usando un mapa de ligamiento (*linkage map*) y revisando como los alelos de esos marcadores co-segregan con la característica de interés (Yue 2014). Encontrar marcadores funcionales que asistan a la selección mediante marcaje es totalmente dependiente de la variabilidad y el nivel polimórfico de la especie. Si se obtiene un ligamiento suficientemente alto, los QTL podrían utilizarse como marcadores de selección. Los

análisis de QTL dependen en mapas de ligamiento, así como familias con un registro de su pedigrí y el fenotipo bien descrito (García de Leaniz *et al.*, 2007).

Los mapas de ligamiento indican la posición y distancia relativa entre los marcadores a lo largo de los cromosomas. El uso más importante de estos mapas es la identificación de loci conteniendo QTLs asociados a la característica de interés, proceso que se denomina mapeo de QTL (Liu *et al.*, 2012). Los marcadores que están más cercanos o con un ligamiento más ajustado, se transmitirán juntos de los padres a su progenie más frecuentemente que los genes que presentan una mayor separación. Mediante el análisis de la segregación de los marcadores, se puede determinar el orden relativo y la distancia entre los mismos (Goddard y Hayes 2009). Mientras más baja la frecuencia de recombinación entre dos marcadores, más cerca se sitúan en un cromosoma. Los marcadores que presentan una frecuencia de recombinación de 50% se describen como no ligados y se asume que están alejados en un mismo cromosoma o que se encuentran en diferentes cromosomas (Collard *et al.*, 2005).

Se utilizan funciones de mapeo para convertir fracciones de recombinación en unidades de mapa llamadas centi-Morgans (cM), haciendo referencia a la separación entre marcadores (Collard *et al.*, 2005). Se debe remarcar que la distancia en los mapas de ligamiento no está relacionada directamente con la distancia física de los marcadores en el DNA. Muchas poblaciones podrían ser utilizadas para determinar QTLs pero las poblaciones F2 provenientes de híbridos F1 con retrocruzamiento, derivada de la cruce de un híbrido F1 con un parental, son las poblaciones más sencillas para el mapeo (Lai *et al.*, 2007).

Se requiere de un procesamiento bioinformático para determinar el ligado entre marcadores. Generalmente se calcula utilizando proporciones de probabilidad de ligado contra no ligado, expresado como el logaritmo de la proporción (LOD). Valores de LOD >3 son usados típicamente para construir los mapas de ligamiento, un LOD de 3 entre dos marcadores indica que el ligado es 1000 veces más probable que el no ligado (Yue 2014).

Ya se han aplicado QTL en la selección de reproductores por marcaje para la mejora del peso corporal, resistencia temperatura, los tiempos de desove, el grado de desarrollo y la resistencia a patógenos en Salmonoides (O'Malley *et al.*,

2003; Somorjai *et al.*, 2003; Nichols *et al.*, 2008; Baranski *et al.*, 2010; Gheyas *et al.*, 2010).

2.4. *Astyanax mexicanus*

2.4.1. Características distintivas

Astyanax mexicanus es un teleosteo que posee fenotipos de superficie y de cuevas. Los peces de trogloditas son endémicos de las cuevas de piedra caliza ubicadas en la región de la Sierra del Abra, San Luis Potosí al noroeste de México. Existen 29 poblaciones conocidas en diferentes cuevas, donde cada población es nombrada según la cueva en la que fue encontrada (Protas y Jeffery 2012). Los organismos trogloditas presentan un fenotipo característico, con diferentes grados de atrofia ocular y deficiencia de pigmentación, según la población de la que provengan (Gross 2012).

A esta especie se le conoce coloquialmente como la sardinita mexicana (Miller *et al.*, 2009). El nombre científico aceptado para el pez de superficie es *Astyanax mexicanus*, mientras que el pez troglodita es nombrado *Astyanax jordani* (Roskov *et al.*, 2013). La primera población troglodita se encontró en 1936 en La Cueva Chica, en la porción sur de la zona caliza de la región de la Sierra de El Abra. Hubbs (1936) designó al pez de cueva con su propio género y especie, nombrándolo *Anoptichthys jordani*, posteriormente se encontraron dos cuevas más a las cuales se les asignaron especies diferentes, *Anoptichthys antrobius* de la cueva Pachón y *Anoptichthys hubbsi* de la cueva de Los sabinos. Posteriormente, Sadoglu (1957) realizó estudios genéticos en donde se detectó la capacidad de reproducirse entre sí de las diferentes poblaciones, demostrando lo cerca que se encontraban relacionadas tanto las poblaciones de cueva como la de superficie y se comenzó a asignar que estas poblaciones pertenecían a uno de dos taxos, *Astyanax fasciatus* o *Astyanax mexicanus* (Ornelas-García y Pedraza-Lara 2016). Actualmente se considera que tanto las poblaciones trogloditas como las de superficie pertenecen a la misma especie *Astyanax mexicanus* y son capaces de reproducirse entre sí, generando descendencia fértil con diferentes grados de atrofia ocular y deficiencia de pigmentación (Figura 1-1) (Protas y Jeffery, 2012; J Bibliowicz *et al.*, 2013).

Las principales diferencias entre poblaciones de superficie y de cuevas son la presencia o ausencia de ojos y de pigmentación, considerando adicionalmente que los híbridos pueden presentar una mayor gama de estas dos características (Hinaux *et al.*, 2011). Las aletas de nado se desarrollan de la misma forma en los dos fenotipos y sus híbridos, presentando 20 rayos en la aleta caudal, con una pigmentación central en peces de superficie e híbridos y sin pigmentación en trogloditas. La aleta anal tiene alrededor de 23 rayos en las poblaciones de superficie y de 20 en híbridos y trogloditas.

2.4.2. Distribución geográfica

El género *Astyanax* es el de mayor distribución de la familia Caracidae, se encuentra desde la Patagonia en Argentina hasta Texas y Nuevo México en Estados Unidos, comprendiendo más de 170 especies (Ornelas-García y Pedraza-Lara 2016). *Astyanax mexicanus* se ubica desde la vertiente del Atlántico de la cuenca del río Bravo en el tercio norte de México, al este de Sonora y Nuevo México, hacia el sur hasta la cuenca del río Pánuco, sistema Cazonas y en tierras altas hasta la cuenca del Río Papaloapan (Figura 2-2 B) (Miller *et al.*, 2009). Las poblaciones de cuevas habitan la región de la Huasteca en México, localizada en la Sierra Madre Oriental, al noroeste de México en los límites entre San Luis Potosí y Tamaulipas (Figura 2-2 A) (Ornelas-García y Pedraza-Lara 2016).

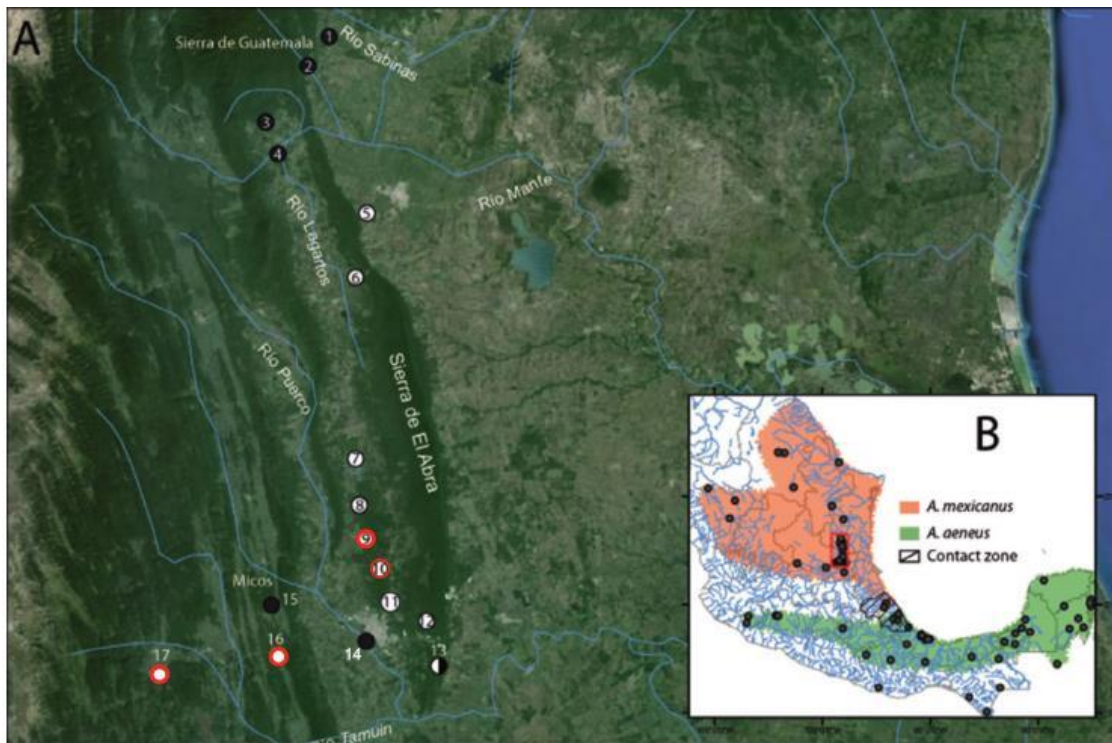


Figura 2-2 (A) Poblaciones de cueva en la región de la Huasteca. Los círculos rojos corresponden a la colonización antigua. (B) Distribución de las poblaciones de superficie, considerando *A. mexicanus* y *A. aeneus*. Sierra de Guatemala: 1= cueva Molino, 2=río Guayalejo, 3= cueva Caballo Moro, 4= río El Limón, 5= Nacimiento del Río Mante; Sierra de El Abra: 6= Pachón, 7= presa Mante, 8= Yerbaníz, 9= Sabinos, 10= Tinaja, 11= Piedras, 12= Curva, 13= Chica, 14= Pte. La Raya; Micos: 15= cueva Micos cave; Linajes antiguos de superficie 16=Rascon, 17=Tamasopo. Modificado de Ornelas-García (2016).

2.4.3. Biología y cultivo

El hábitat de las poblaciones de superficie incluye remansos en ríos hasta una profundidad de 3 m y aguas estancadas bastante someras de corriente moderada. Tienden a nadar en cardúmenes de 50 o más individuos siendo muy abundante y generalmente dominante (Miller *et al.*, 2009).

Las poblaciones de superficie realizan una alimentación muy variada, reportando una dieta de 62% vegetación, 22% material animal y el resto detritus. Consume también huevos, larvas y juveniles de peces (Miller *et al.*, 2009). La alimentación dentro de las cuevas incluye el guano de murciélago, los parásitos internos en el guano, grillos, otros peces (canibalismo), moscas, murciélagos muertos, ranas, algunos crustáceos y probablemente basura proveniente de

inundaciones. Se reporta que los peces de cuevas se alimentan del fondo y que no forman grupos, pero pueden ser oportunistas y alimentarse en cualquier parte de la columna de agua, especialmente de objetos flotantes (Elliott 2016).

Astyanax mexicanus ha sido comercializado en acuarios de E.U.A. desde 1940 (Borowsky 2008a). A pesar de esto solo existe información básica sobre los requerimientos diferenciales de cada población de esta especie (Borowsky, 2008a; Elipot *et al.*, 2014b). Es importante resaltar que no existen reportes de su producción dentro de territorio mexicano.

Las recomendaciones que existen para el manejo y mantenimiento de la especie en laboratorio son las mismas que las usadas para el pez cebrá, con ligeras modificaciones debido a su diferencia en tamaño. De igual forma se debe considerar que el mantenimiento y manejo de las poblaciones de superficie es diferente a las de cueva, debido a su grado de agresividad. Para el caso de las poblaciones trogloditas, se recomienda el uso de tanques de 17 litros para la reproducción y mantenimiento de grupos de hasta 8 adultos. Tanques de 50 litros pueden acomodar hasta 25 adultos y para mantener organismos en aislamiento se recomienda el uso de contenedores de 3.75L (Borowsky 2008a). En cuanto a las poblaciones de superficie se recomienda su mantenimiento en grupos numerosos en tanques de más de 100 litros (Elipot *et al.*, 2014b).

Los organismos silvestres de esta especie viven en agua corriente, aceptando de forma adecuada un rango de temperatura desde los 19°C hasta los 27°C (Borowsky 2008a). La temperatura media en el agua de las cuevas es de aproximadamente 23.1 °C, con una desviación estándar de 2.6°C, mientras que la temperatura promedio en la superficie es de 24.7 °C.

2.4.4. Reproducción

La reproducción de *Astyanax mexicanus* es inducida de forma natural por los cambios ambientales generados a partir de una lluvia, por lo que se ha propuesto realizar un cambio de temperatura durante una noche para estimular el desove de las diferentes poblaciones (Elipot *et al.*, 2014b).

Para las poblaciones de superficie la lluvia causaría un descenso de temperatura, por lo que se ha realizado un cambio de 26°C a 22°C durante la noche

para provocar el estímulo. En las cuevas la lluvia genera un aumento de temperatura, por lo que se utiliza la modificación de la temperatura de 22°C a 26°C para inducir la reproducción. En ambos casos la temperatura deberá de regresar a su estado original en la mañana siguiente al estímulo para producir el desove (Elipot *et al.*, 2014b).

La población de superficie desova de forma silvestre en México de mediados del invierno a fines de primavera (Miller *et al.*, 2009), pero se reporta que en el laboratorio pueden reproducirse a lo largo de todo el año (Borowsky 2008a). Las hembras son capaces de reproducirse cada 2 semanas, desovando hasta 1000 huevos. Ninguna de las poblaciones presenta cuidados parentales, después del desove si se da la oportunidad los adultos se comerán sus propios huevos (Elipot *et al.*, 2014b).

2.4.5. *Potencial Astyanax mexicanus como modelo de estudio*

Astyanax mexicanus es un organismo ideal para realizar estudios de comparación entre especies ya que pertenece a la familia Characidae, la cual incluye especies comerciales de importancia para la acuicultura, tal como el caso de las pirañas, los pacus o los tetras (Strickler y Jeffery 2009; Gross 2012). Adicionalmente se prevé que debido a su cercanía con el pez modelo Cebra, el cual se ha utilizado para realizar estudios de importancia para la acuicultura (Ribas y Piferrer, 2014; Ulloa *et al.*, 2014), *A. mexicanus* podrá dar información relevante para otras especies de interés acuícola, como pueden ser los peces gato (Figura 2-3) (Strickler y Jeffery, 2009; Ulloa *et al.*, 2014). La relaciones filogenéticas entre *A. mexicanus* y el pez cebra permiten el uso cruzado de las herramientas disponibles para el pez cebra, el cual es el modelo acuático más estudiado (Strickler y Jeffery 2009).

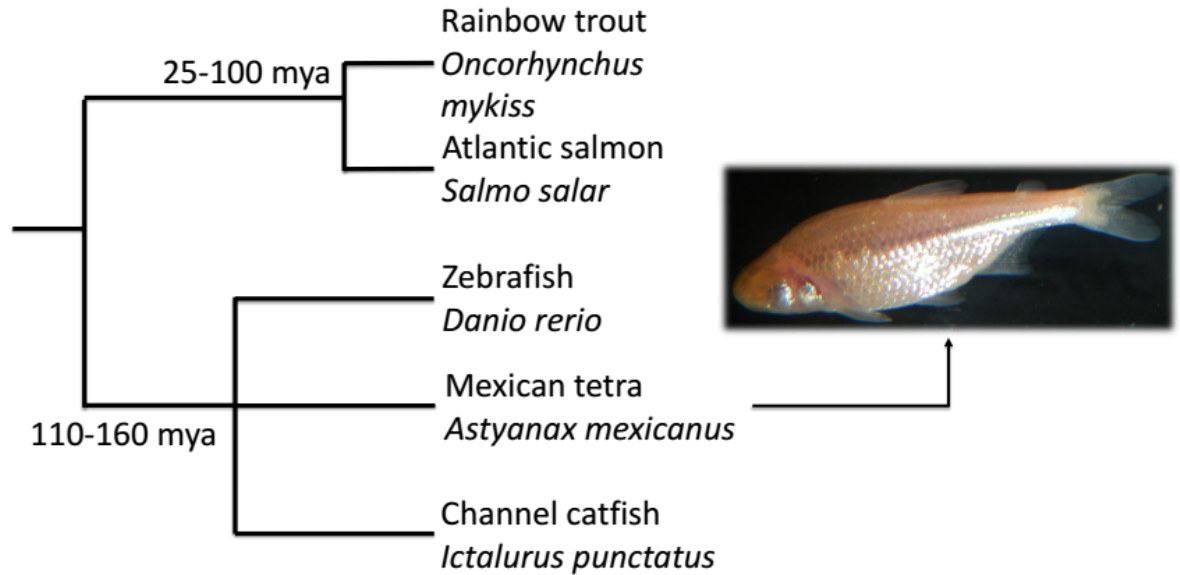


Figura 2-3 Ejemplo de relaciones filogenéticas en Teleósteos incluyendo *A. mexicanus*. Modificado de (Ulloa *et al.*, 2011).

Los diferentes fenotipos de *A. mexicanus* han permitido su uso como un sistema modelo en estudios de desarrollo y evolución (Protas y Jeffery, 2012; Elipot *et al.*, 2014b; Keene *et al.*, 2016). Las poblaciones trogloditas cubrieron sus requerimientos de supervivencia a las condiciones dentro de las cuevas en forma diferente, por lo que existen poblaciones con fenotipos similares que fueron obtenidos mediante una evolución independiente, lo que permite la comparación directa de estos polimorfismos, entre las poblaciones naturales y sus híbridos (Figura 2-4), con el fin de determinar la causa genética de los mismos (Hinaux *et al.*, 2011; Coghill *et al.*, 2014; Keene *et al.*, 2016). Entre las características diferenciales que adquirieron, además de haber perdido la vista y la pigmentación, la mayoría de las poblaciones de cueva eliminaron sus conductas gregarias y de agresividad, pero se ha reportado que existen organismos ciegos agresivos (Espinasa *et al.*, 2005), mientras que otras poblaciones cambiaron sus conductas gregarias independientemente de su fisiología (Kowalko *et al.*, 2013). Estas características permiten que *A. mexicanus* de oportunidades para estudiar comportamientos de interés en la acuicultura, como son las conductas gregarias y la agresividad.

Finalmente es importante considerar que el pez ciego es resistente y tiene la capacidad de ser cultivado con una dieta simple, desovando frecuente y abundantemente, con un tiempo de generación entre 4 y 6 meses, características ideales para un organismo de laboratorio (Jeffery 2008).

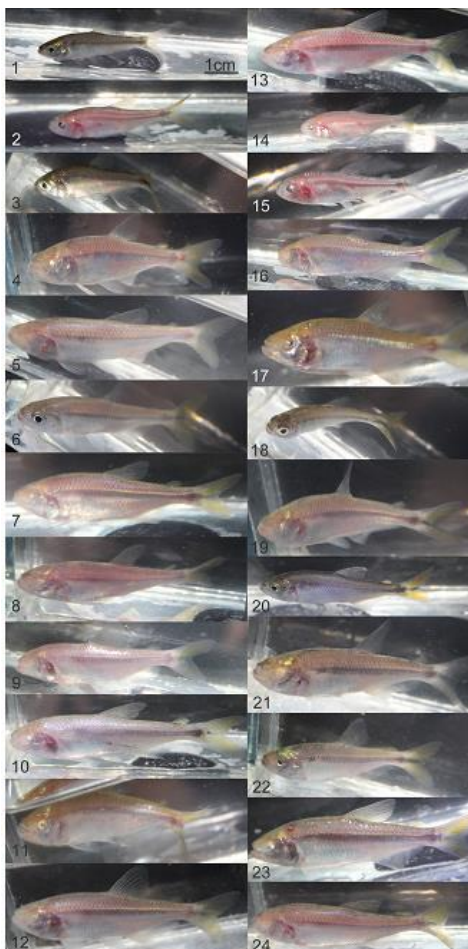


Figura 2-4 Fenotipos híbridos de *Astyanax mexicanus* presentes en la cueva del Subterráneo. 24 individuos capturados mediante red. Tomado de (Jonathan Bibliowicz *et al.*, 2013).

2.4.1. Comportamiento de *Astyanax mexicanus*

Los organismos cavernícolas perdieron su vista y pigmentación en diferentes grados a la vez que adquirieron otras características a partir de su evolución a lo largo de miles de años bajo condiciones de obscuridad, incluyendo cambios en su comportamiento, entre los que destacan:

- Comportamiento de alimentación. Los peces de cuevas cambiaron la forma de alimentarse, estos nadan de forma diagonal y gastan un mayor tiempo buscando alimento en el fondo. Adicionalmente los peces trogloditas, en comparación con los de superficie, se alimentan de forma continua, pero con una mejor capacidad de supervivencia a la falta de alimento obteniendo un mayor peso para organismos de la misma talla (Salin *et al.*, 2010; Elipot *et al.*, 2013; Johanna E Kowalko *et al.*, 2013; Rétaux y Elipot, 2013; Soares y Niemiller, 2013; Volkoff, 2016).
- Comportamiento de reproducción. Como ya se mencionó, ambas poblaciones son inducidas al desove a partir de un aumento o disminución en la temperatura del agua, dependiendo de si es un pez de cueva o de superficie respectivamente. Otro cambio en su conducta reproductiva es la forma de seleccionar a su pareja reproductiva, ya que las poblaciones de superficie utilizan estímulos visuales para la selección, mientras que las de cueva no pueden llevar a cabo este proceso (Plath *et al.*, 2006; Elipot *et al.*, 2014b).
- Pérdida de sueño y cambios en su reloj circadiano. Las poblaciones de cueva perdieron durante su evolución su ritmo biológico al no contar con el estímulo generado por los cambios lumínicos diarios. Estas poblaciones no presentan un horario definido de alimentación, y no presentan un patrón de sueño, sino que tienden a tener periodos aleatorios de actividad y descanso (Cavallari *et al.*, 2011; Duboué *et al.*, 2011; Duboué *et al.*, 2012; Duboué y Borowsky, 2012; Beale *et al.*, 2013; Yoshizawa *et al.*, 2015; Duboué y Keene, 2016).
- Comportamiento de vibración y atracción. Las poblaciones de superficie tienen a alejarse de este estímulo, mientras que algunas poblaciones de cueva se acercan a este estímulo en busca de posibles oportunidades de alimentación (Yoshizawa *et al.*, 2010; Yoshizawa *et al.*, 2014; Yoshizawa, 2016).
- Comportamiento de alarma reducido. Los peces tienden a responder a diversas señales de alarma producidas por sus congéneres al momento de sufrir algún estímulo de estrés. Los peces de superficie responden de la

forma “normal” a este estímulo, mientras que los trogloditas tienen una disminución significativa de esta respuesta (Fricke, 1987; Hinaux *et al.*, 2016).

- Navegación. Peces de superficie realizan su navegación a través de estímulos visuales, mientras que los peces de cueva utilizan una línea lateral con mayor número de sensores para moverse en su medio. Por lo tanto, los peces trogloditas requieren de realizar cambios en su velocidad de nado para lograr detectar y memorizar su entorno (Burt de Perera, 2004; Burt De Perera, 2004; Braithwaite y De Perera, 2006; Patton *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011; Holbrook y Burt de Perera, 2013).
- Perdida de conductas gregarias. Los peces de superficie en condiciones silvestres tienden a formar grupos de más de 50 peces que nada en conjunto a lo largo del cuerpo de agua, mientras que los peces de cueva tienen un nado aleatorio sin un comportamiento gregario determinado (Gregson y Burt De Perera, 2007; Johanna E. Kowalko *et al.*, 2013).
- Territorialidad, jerarquía y agresividad. Los organismos de superficie marcan territorios y lo defienden a través de comportamientos agresivos, de igual forma dentro de los grupos sociales que forman los peces marcan jerarquía, en donde existirá un pez dominante y múltiples subordinados y dependiendo de la cantidad de peces presentes, el dominante puede llevar a cabo comportamientos agresivos en contra de algún subordinado. Todos estos comportamientos se han perdido en las poblaciones de cuevas (Espinasa *et al.*, 2005; Elipot *et al.*, 2013; Rétaux y Elipot, 2013; Elipot *et al.*, 2014a; Hinaux *et al.*, 2016).

Las investigaciones realizadas sobre las diferencias conductuales entre las poblaciones de superficie y las poblaciones trogloditas se han enfocado a identificar las causas de su evolución diferencial, pero no se ha planteado su uso para la identificación de marcadores conductuales en la especie.

La agresividad en *A. mexicanus* se presenta en las poblaciones de superficie desde los 16 días post fertilización, con un tamaño de apenas 12 mm. Esta agresividad no se relaciona a territorialidad durante los primeros 10-12 meses (Hinaux *et al.*, 2016). En adultos los organismos de superficie presentan agresividad

debido al establecimiento de jerarquías y los subordinados que no tienen donde escapar o esconderse, eventualmente mueren (Espinasa *et al.*, 2005; Elipot *et al.*, 2013). En cuanto a las poblaciones de cueva los estudios sugieren que la conducta de agresividad se ha perdido, a pesar de que se llegan a observar algunos ataques en las poblaciones de Micos, Piedras y Pachon, pero estos ataques se asociaron al comportamiento de alimentación (Espinasa *et al.*, 2005; Elipot *et al.*, 2013). Durante los ensayos de residente-intruso la población de superficie realiza 10 veces más ataques que las poblaciones de cueva de Pachon o Molinos, más de 1000 contra 100 (Elipot *et al.*, 2013). Originalmente se propuso que esta diferencia se debía a la incapacidad de ver el estímulo visual que generaba el ataque, por lo que se realizaron estudios con el fin de determinar el papel que tenían los ojos en los ataques. El resultado fue que aunque los ojos participan en la generación de los ataques, estos no son el único factor (Hinaux *et al.*, 2016). Se realizó una cirugía en el estado larval de los peces de superficie en donde se extrajeron ambos ojos dejándolos ciegos de forma artificial, y se encontró que la agresividad se conserva (Yamamoto y Jeffery 2000; Espinasa *et al.*, 2005; Elipot *et al.*, 2013).

La agresividad parece estar codificada genéticamente en *Astyanax mexicanus*, organismos de superficie aislados desde antes de su eclosión presentaron conductas de agresividad desde el primer contacto con otro organismo, sugiriendo que la conducta de agresividad es un comportamiento innato (Bierbach *et al.*, 2012; Elipot *et al.*, 2013; Hinaux *et al.*, 2016). Los híbridos entre poblaciones de superficie y de cuevas presentan en su F1 una agresividad moderada, mientras que las retrocruzas con peces de cueva no muestran agresividad y las retrocruzas con peces de superficie tienen un nivel alto de agresividad. Esto sugiere que los alelos de las poblaciones de cuevas reprimen las conductas de agresividad (Hinaux *et al.*, 2016). Se ha propuesto que esta reducción en la agresividad se debe a una pérdida de la función en la enzima monoamina oxidasa (MAO) causada por una mutación puntual en peces de cueva (Elipot *et al.*, 2014a). MAO es una enzima que degrada selectivamente la serotonina (5-HT), pero no la dopamina o la norepinefrina, generando elevados niveles de 5-HT y bajos niveles del metabolito de la serotonina (5HIAA) en el cerebro de los organismos trogloditas. Adicionalmente se encontró que al tratar las poblaciones de superficie con deprenil, el inhibidor de MAO, el

número de ataques disminuye considerablemente (Elipot *et al.*, 2013). A pesar de que se haya identificado la participación de MAO y la serotonina en la diferencia de agresividad en esta especie, aún no está claro cuál es la red de serotonina que está involucrada en estos cambios (Hinaux *et al.*, 2016), ni si es posible determinar un marcador genético que represente los diferentes niveles de agresividad.

2.5. Principales grupos de investigación

Los estudios realizados en el comportamiento de *Astyanax mexicanus* no son muy numerosos ya que este es un nuevo modelo que aún no está tan difundido como es el caso del pez modelo por excelencia, el pez cebra. El reducido número de grupos que están trabajando con el comportamiento de esta especie mantienen por lo general líneas de investigación muy definidas. A continuación, se presentan los principales grupos que estudian el comportamiento en *A. mexicanus*, así como su representante principal y su área de estudio:

- Estados Unidos de América
 - Hawái, University of Hawaii, investigador principal M. Yoshizawa donde estudian las adaptaciones sensoriales. Publicaciones hasta el 2016.
 - Maryland, Carneige Institute for science. E. R. Duboué, estudios sobre pérdida de patrón de sueño.
 - Florida, Florida Atlantic University. A. C. Keen, colaboraciones sobre pérdidas de patrón de sueño y estudios relacionados con desarrollo y evolución.
- Canadá
 - Newfoundland and Labrador, Memorial University of Newfoundland, investigador principal H. Volkoff, donde estudian el comportamiento relacionado con la alimentación. Sus últimos trabajos son del 2016.
- Reino Unido
 - Inglaterra, University College London, investigadores A. D. Beale y D. Whitmore, estudio de patrones circadianos en la especie.
- Francia

- Gif-sur-Yvette, Neuro-Paris Saclay Institute, Investigadores principales Y. Elipot y S. Rétaux, estudios sobre comportamientos sociales y agresividad.

Aunque existen otros grupos que trabajan con la conducta de la especie, por lo general realizan colaboraciones con los grupos anteriores, tal es el caso de la publicación de L. Espinasa (2017), en donde participaron integrantes de grupos de Nueva York USA, Paris Francia y de Gif-sur-Yvette, Francia, realizando un estudio sobre los hábitos alimenticios de la población troglodita.

Es importante hacer notar que, aunque se trata de una especie endémica de México no existe un grupo de importancia que este aprovechando nuestros recursos naturales. Existen algunas publicaciones aisladas en donde han participado universidades mexicanas, pero son la excepción, como es el caso del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Autónoma de México en Puerto Morelos, con el investigador principal E. Maldonado. Han realizan estudios en la navegación y el mapeo espacial de la especie relacionándolo a su Evolución y desarrollo.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diagrama general

El presente trabajo se realizó con la finalidad de comenzar con la identificación de marcadores genéticos candidatos para la predicción de niveles de agresividad en *Astyanax mexicanus*. Adicionalmente se buscó el establecimiento de diferentes linajes de la especie nativa *Astyanax mexicanus*, tanto para su uso en investigación, como para su posible comercialización como especie de ornato. En la **Figura 3-1** se presenta el diagrama general de las actividades realizadas para lograr los objetivos propuestos.

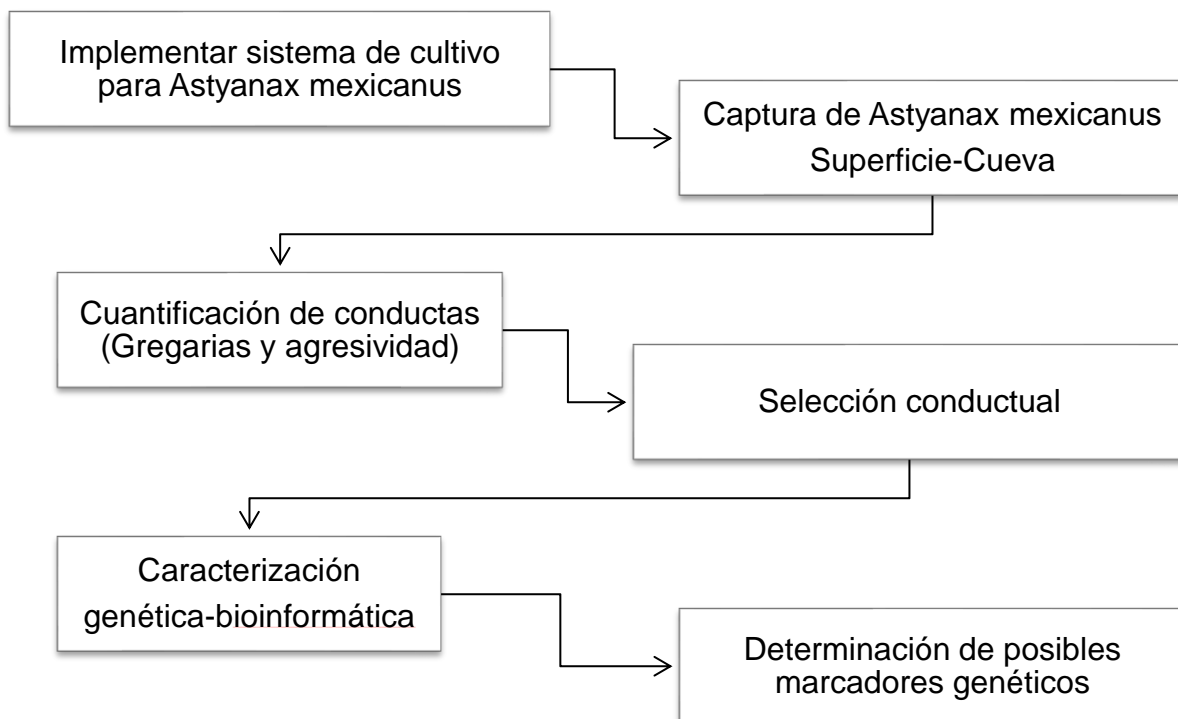


Figura 3-1 Diagrama general de las actividades realizadas durante el trabajo experimental.

3.2. Implementación de un sistema de cultivo para diferentes poblaciones de *Astyanax mexicanus*

Para mantener los diferentes linajes de *A. mexicanus* incluyendo los peces de cueva (PC) y los peces de superficie (PS) se implementó un sistema con la

capacidad de mantener las condiciones ambientales requeridas para el correcto cultivo de la especie de interés, tomando en cuenta lo reportado por Borowsky (2008a) y Elipot *et al.*, (2014b) así como las observaciones propias realizadas en campo.

3.2.1. Sistema en rack

El diseño del sistema de cultivo se realizó con un enfoque productivo por lo que se dio importancia al aprovechamiento del espacio y la facilidad de manejo. Se propuso un sistema en rack para maximizar el aprovechamiento de espacio (Figura 3-2). Se consideró el uso de tanques modulares de 20L para el mantenimiento de organismos en aislamiento o para el crecimiento de alevines; tanques de 40 L para el mantenimiento de juveniles de cualquier población o hasta 8 organismos de cueva adultos; tanques de 120 L para el mantenimiento de grupos numerosos de peces de cueva y el mantenimiento general de peces de superficie, reduciendo los ataques entre organismos como se ha reportado previamente (Elipot *et al.*, 2014b). El rack consiste en 5 niveles de tanques, cada nivel acepta hasta 6 tanques de 20 L, tres de 40 L o uno de 120 L (Figura 3-3). El sistema proporciona la opción de intercambiar la posición de los tanques, combinando por ejemplo uno de 40 L con cuatro de 20 L en un mismo nivel, o colocando el tanque de 120 L en cualquier nivel del rack (Figura 3-2.1).

Todas las salidas de agua se conectan al mismo sistema de tuberías de desagüe que terminan en el sistema de filtración (Figura 3-2.3). El número de salidas de agua de cada tanque depende de su tamaño, los tanques de 20 L tienen 1 salida, los de 40L 2 salidas y los de 120 L se propusieron con 6 salidas (Figura 3-3). Como se requiere el constante movimiento de los tanques, tanto para limpieza como para manejo de los peces, las conexiones de salida de cada tanque a las tuberías de desagüe no son fijas, estas se insertan sin realizar un cierre hermético (Figura 3-4.A), permitiendo retirar fácilmente los tanques cuando se requiera, incluso cuando estos están llenos ya que los tanques cuentan con una salida de agua en forma de rebosadero que permite delimitar el nivel deseado de agua a la vez que realiza una correcta limpieza del fondo del tanque al facilitar un flujo directamente desde el fondo del sistema.

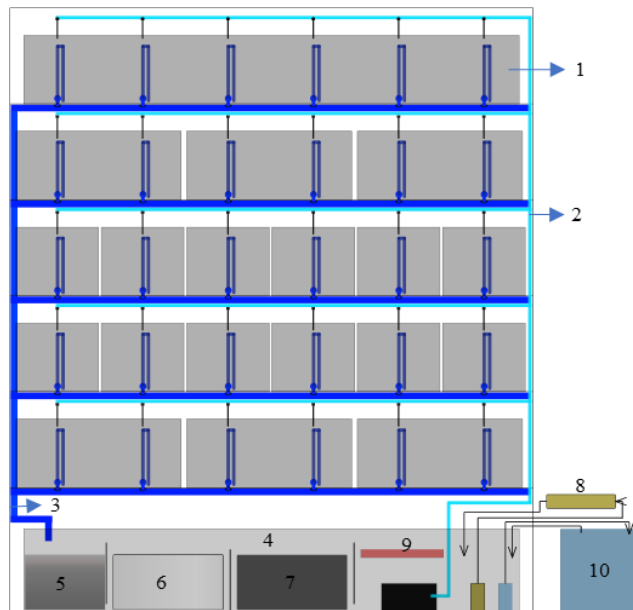


Figura 3-2 Representación esquemática del sistema de cultivo en rack. 1, Tanques de cultivo; 2, Entrada de agua; 3, Salida de agua; 4, Sistema de filtración; 5, Filtración mecánica (esponja); 6, Filtración biológica (cerámica); 7, Filtración química (carbón activado); 8, Lámpara UV; 9, Termostato; 10, chiller.

La entrada de agua es suministrada desde el sistema de filtración a través de una bomba de recirculación de agua de 7500L/h. La tubería de entrada se reparte en 6 salidas por cada nivel del rack (Figura 3-2.2), dependiendo del tamaño del tanque es el número de entradas de agua que recibe, de igual forma que con las salidas (Figura 3-4.B). Cada salida cuenta con una válvula de agua para el control del flujo, así como una manguera que guía el agua de la tubería a tanque correspondiente. Las entradas de agua pueden cerrarse en caso de que un tanque no esté en uso dentro del rack. La bomba de recirculación cuenta con una válvula de escape de presión para evitar el exceso de presión dentro de la tubería. La entrada de agua en la parte superior del tanque, así como la toma del rebosadero desde el fondo de este, facilitan la homogeneidad de la calidad del agua con una correcta oxigenación.

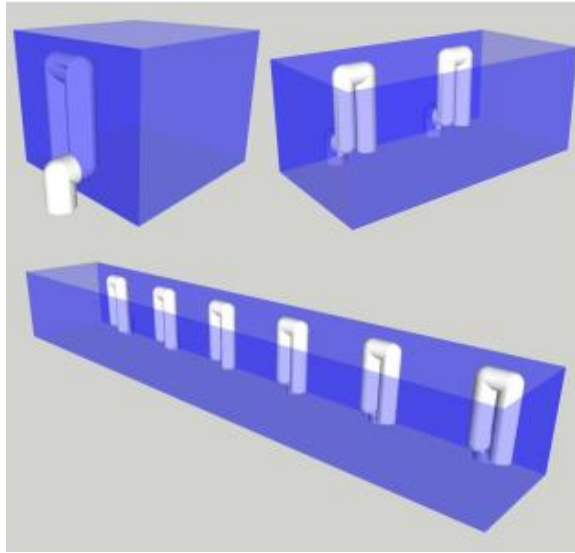


Figura 3-3 Representación esquemática de los tanques modulares del sistema en rack. El número de salidas de agua depende del tamaño del tanque.

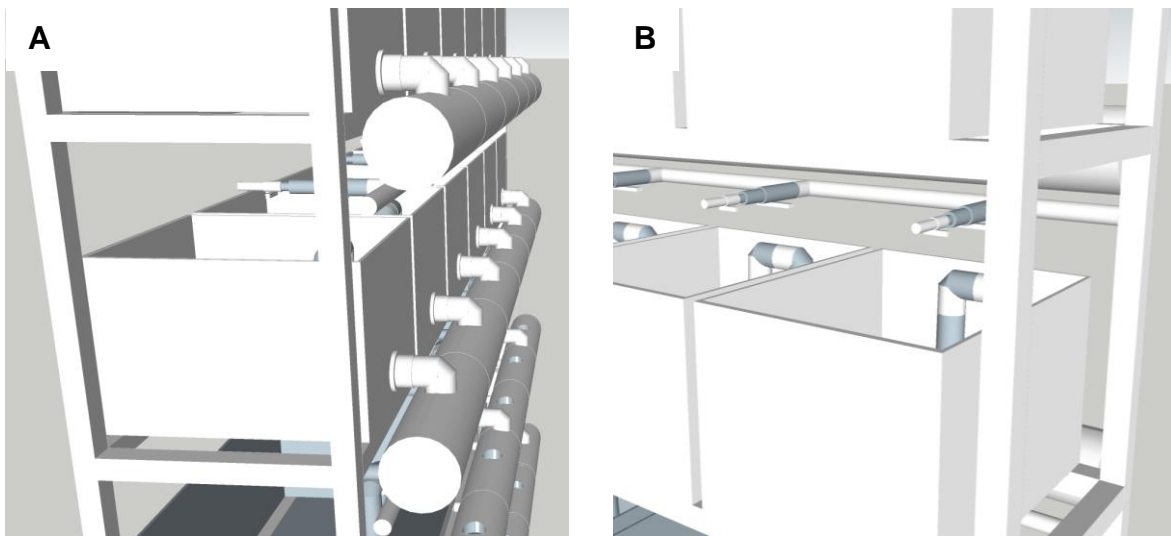


Figura 3-4 Representación esquemática de la conexión de los tanques al desagüe del sistema (A) y la entrada de agua (B).

3.2.2. Sistema de filtración

La tubería de desagüe deposita el agua al principio del sistema de filtración (Figura 3-2.3). El sistema de filtración busca mantener la calidad de agua adecuada para el cultivo y reproducción de la especie, siguiendo las recomendaciones

encontradas en la bibliografía donde se controlan los niveles de compuestos nitrogenados, así como el pH del agua (Borowsky 2008a; Harrington 2012; Lawrence y Mason 2012). El sistema consiste de tres etapas principales, comenzando con un filtro mecánico de esponja para detener las partículas de mayor tamaño. La segunda etapa, de filtración biológica, utiliza cilindros para acuario de cerámica para facilitar el establecimiento de bacterias benéficas desnitrificantes gracias a su alta porosidad. Finalmente, se realiza una filtración química mediante una capa de carbón activado para disminuir las moléculas en el agua (Timmons *et al.*, 2010). Adicionalmente el sistema cuenta con una lámpara UV (Boyu UVC-15) para disminuir el contenido de microorganismos. El pH inicial fue regulado a 7 mediante buffers comerciales de la marca Seachem (Alkaline Buffer; Acid Buffer) para garantizar el valor óptimo para la especie.

3.2.3. Regulación de temperatura y fotoperiodo

El sistema tiene la capacidad de regular la temperatura para cada población, variando desde los 19 °C hasta los 27 °C. El aumento de temperatura se logra a través de un termostato de 500W (Ista I-H829), y para la disminución se usa un chiller para 500L (Boyu C250). Ambos dispositivos se programan a la temperatura deseada brindando la capacidad de aumentarla o disminuirla en un periodo corto de tiempo manteniéndola de forma indefinida dentro de un rango determinado.

Para la regulación del fotoperiodo se cuenta con una cubierta alrededor del sistema en rack en forma de “cajones”, en donde cada nivel del rack cuenta con una puerta horizontal para abrir independientemente el nivel con el que se trabaja. La regulación del fotoperiodo se logra utilizando tiras led para proporcionar una iluminación suficiente para el crecimiento, como se ha reportado previamente en otras especies (Aguirre-Becerra y Soto-Zarazúa 2013). Un cronometro digital en el suministro eléctrico permite asignar horarios de encendido y apagado de la iluminación.

3.2.4. Pruebas de funcionamiento para mantenimiento

El funcionamiento del sistema en rack se verifico mediante el monitoreo de las condiciones del agua. El sistema se maduró durante 30 días previamente a las mediciones. El periodo experimental consistió de siete días, realizando mediciones

en el filtro y en un tanque de cultivo. La temperatura del agua fue medida con una data loguer (WatchDog series 1000, USA) cada 30 minutos. Diariamente se realizaron mediciones con el equipo multiparamétrico HQ40D de HACH, USA utilizando el sensor LDO101-05 para el oxígeno disuelto ($^{\circ}\text{C}$ and $\text{O}_2 \text{ mgL}^{-1}$), la sonda PHC101-05 para el pH y el sensor CDC401-05 para la conductividad ($\mu\text{S/cm}$). De igual forma el análisis del contenido de nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_4^+ \text{ mg L}^{-1}$) se realizó diariamente durante el periodo experimental a través de técnicas espectrofotométricas usando el espectrofotómetro DR/6000 (Hach) con el método 380N.

Se realizaron dos pruebas independientes con el mismo sistema, la primera buscando mantener una temperatura de 26°C y la segunda con una temperatura de 22°C . Las pruebas de funcionamiento se realizaron originalmente en el laboratorio de Bioingeniería del campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, aunque, el lugar final de la instalación de los sistemas en rack, así como el mantenimiento de los stocks de las diferentes variedades de *A. mexicanus* se realizó en el módulo acuícola del campus Conca de la Universidad Autónoma de Querétaro.

3.2.5. Pruebas de funcionamiento para la inducción de reproducción

Se realizó una prueba para identificar la capacidad del sistema de otorgar las temperaturas requeridas para inducir el desove de las PC Y las PS, simulando los cambios observados después de una lluvia en su medio silvestre (Elipot *et al.*, 2014b). PS requieren de un cambio de temperatura de 26°C a 22°C durante la noche, mientras que PC requieren de un aumento de 22°C a 26°C .

La temperatura del agua fue medida con una data loguer (WatchDog series 1000, USA) cada 30 minutos. Se realizaron dos pruebas independientes para probar los cambios de temperatura. La temperatura deseada se ajustó a las 7 pm y se regresó a la temperatura original a las 7 am, así la primera prueba constó de un cambio de temperatura de $26-22-26^{\circ}\text{C}$ y la segunda de $22-26-22^{\circ}\text{C}$. Ambas pruebas se realizaron con el mismo sistema en rack.

3.3. Linajes de *Astyanax mexicanus*

3.3.1. Captura de poblaciones silvestres

Las poblaciones de PC de *A. mexicanus* no se localizan con facilidad ya que los reportes de bibliografía no indican la ubicación exacta de las mismas, debido a esto se requirió de una búsqueda en campo para la localización de algunas cuevas de interés. Se propuso investigar la ubicación de tres poblaciones de PC diferentes para seleccionar la población que se adaptara mejor a las necesidades y facilidades del proyecto. Se propuso buscar las poblaciones de Sabinos, Chica y Micos considerando su ubicación que facilitaba su acceso. Durante la primera visita se tomaron muestras de agua midiendo temperatura, pH, salinidad y dureza con el fin de preparar los sistemas para recibir a los organismos con condiciones ambientales similares a las silvestres.

Posterior a la selección de la población de PC objetivos se realizó la captura con una red de mano. Los peces fueron transportados en contenedores de 20 L a una densidad menor a 10 peces por contenedor. Durante el viaje de 12 horas desde la captura se mantuvo el oxígeno disuelto al usar perlas comerciales de oxígeno en polvo para acuario (Sera O₂ plus). Posterior a su llegada se aclimataron en un sistema de cuarentena durante 15 días realizando un tratamiento general contra parásitos. Se les proporcionó alimento comercial para pez tropical (Tetra) al momento de su llegada. Finalmente se introdujeron al sistema de cultivo.

Las poblaciones de PS se capturaron de los manantiales ubicados en el poblado de Conca, Arroyo Seco, Qro., mediante el arte de pesca de chinchorro. Los peces fueron trasladados al laboratorio en contenedores de 20 L y se introdujeron en el sistema de cuarentena durante 15 días realizando un tratamiento general contra parásitos. Se les proporcionó alimento comercial para pez tropical (Tetra) al momento de su llegada. Posteriormente se introdujeron al sistema de cultivo principal.

Con la finalidad de obtener una población adecuada para mantener correctamente los linajes, se capturaron suficientes individuos para lograr la formación de 12 pares reproductivos por cada población, evitando el deterioro genético como se ha reportado previamente (Brand *et al.*, 2002). En campo se

realizó una determinación taxonómica siguiendo lo indicado en reportes previos (Miller *et al.*, 2009).

3.3.2. Reproducción de poblaciones silvestres

Las poblaciones silvestres de PC Y PS se reprodujeron siguiendo lo establecido en la bibliografía, incluyendo el manejo de huevos y larvas (Borowsky, 2008b; Borowsky, 2008c; Elipot *et al.*, 2014b). Cada población se mantuvo en sistemas aislados y nunca se mezclaron individuos de PC con PS. La reproducción de *A. mexicanus* se induce al simular un evento de lluvia en el sistema. Por esta razón los PC requieren un aumento en la temperatura del agua de alrededor de 4°C mientras que PS requieren una disminución de temperatura de la misma magnitud. Estos cambios de temperatura fueron proporcionados gracias al sistema de cultivo en rack como ya se mencionó previamente.

Las hembras fueron preparadas para el desove al incrementar su ingesta calórica proporcionando alimento vivo, el gusano de tierra grindal (*Enchytraeus Buchholzi*), junto con el alimento de mantenimiento desde 15 días previos al estímulo de inducción de reproducción. La reproducción para el aumento del número de organismos de cada población se realizó en tanques comunitarios, realizando el cambio de temperatura correspondiente siguiendo la metodología de la prueba para inducción de reproducción mencionada previamente en este capítulo.

Para facilitar la recolección de los huevecillos se colocaron cajas de acrílico al fondo de los tanques de reproducción, cubiertos de una malla plástica para evitar el canibalismo. El desove se recolectó al día siguiente de la conclusión del estímulo de reproducción. Los huevecillos se mantuvieron en el contenedor acrílico hasta su eclosión cuando fueron introducidos a un tanque independiente del sistema de cultivo con agua tratada con azul de metileno. Los organismos se mantuvieron en este tanque hasta llegar a la etapa juvenil.

3.3.3. Determinación del sexo para la selección de reproductores.

Se requirió de la identificación de machos y hembras para preparar la reproducción. El dimorfismo sexual de *Astyanax mexicanus* se observa principalmente en la forma del cuerpo y de la aleta anal. Por lo general las hembras son de mayor tamaño con una aleta anal más larga. Sin embargo, no siempre se

puede determinar el sexo de un adulto por estas diferencias, por lo que se propuso evaluar el sexo revisando la presencia o ausencia de dentículos o elementos óseos en forma de gancho en los rayos de aleta anterior de la aleta anal. Esta característica se observa como una opacidad hacia la mitad anterior de la aleta anal de los machos (Borowsky 2008d). Con el fin de identificar el sexo de los peces se siguieron los siguientes pasos:

- Los peces fueron anestesiados en contenedores separados sumergiéndolos en 200 mL de una solución MS222 (Tricaina metanesulfonato al 0.2% en H₂O a pH 7.5) por 30 segundos o hasta que se observaron desorientados.
- Se usó algodón comercial para frotarlo en la porción anterior de la aleta anal distalmente, si el algodón se atoraba se consideraba que se trataba de un macho adulto, de lo contrario podría ser una hembra o juvenil.
- Si el pez era macho se confirmaba con un estereoscopio a 10X (Zeiss) al observar la presencia de elementos óseos tipo gancho en los rayos de aleta anterior.
- Para la recuperación de la anestesia MS222, los peces se colocaron en el agua del sistema hasta detectar signos de movimiento. Si los peces no volvían en sí en 1 minuto, se recuperaban sosteniéndolos de la sección media y dirigiendo a su boca una corriente de agua con una pipeta de plástico desechable.

3.4. Determinación de niveles de agresividad de *Astyanax mexicanus*

Los diferentes patrones de comportamiento de interés se estudiaron siguiendo lo establecido en investigaciones previas con algunas modificaciones (Beale *et al.*, 2013; Elipot *et al.*, 2013; Johanna E. Kowalko *et al.*, 2013). Los parámetros a determinados fueron:

- Número de ataques por minuto (NAM): Se consideró un ataque cuando el pez objetivo realizó un contacto con el pez plastificado, separándose más de 5% del espacio de prueba en menos de 10 cuadros del tiempo.

- Proporción de la distancia al vecino más cercano (DVC): Se consideró como el promedio de la proporción del espacio del tanque de prueba desde el centro del cuerpo del pez hacia el centro del cuerpo del pez plastificado más cercano durante la grabación.
- Proporción del tiempo gastado en cardumen individualmente (TGC): Se consideró como el tiempo que el organismo objetivo pasó en el grupo del cardumen de peces plastificados, tomando en cuenta que se encontraba dentro del grupo si la distancia al pez plastificado más cercano era de un 10% del tanque de prueba. Se comenzaba a contabilizar el tiempo en cardumen posterior a cumplir los requisitos durante 10 cuadros de grabación. El tiempo gastado en cardumen se dividió por el total del tiempo de grabación para obtener la proporción correspondiente.

Para realizar las observaciones de agresividad y conducta gregaria se utilizó una cámara web programada para grabar a 10 cuadros por segundo. La determinación del NAM se realizó mediante una prueba de residente-intruso, donde se usó un sistema de recirculación de agua con tanques circulares de 30 cm y una profundidad de 10 cm (Figura 3-5.A).

3.4.1. Cuantificación del nivel de agresividad

La prueba de residente-intruso tradicional implica el uso de un organismo a analizar, el cual se mantiene en un tanque de prueba para posteriormente introducir un pez intruso que generaría los ataques (Elipot *et al.*, 2013). Este enfoque causa una gran variabilidad ya que los peces intrusos pueden tener un nivel de agresividad diferente, modificando a su vez la respuesta del residente. Por lo tanto, se propuso el uso de organismos plastificados para generar los ataques. Se plastificaron con resina epoxica transparente 6 alevines de tilapia, secados previamente.

Se realizó una prueba de respuesta en organismos de superficie para observar si existía una respuesta al estímulo del intruso plastificado. Tres PS y tres CF se introdujeron al sistema de prueba de conducta 24 horas previas a la grabación. Se grabaron los 6 peces a la vez durante 45 minutos. La grabación se repitió dos veces más en los días siguientes a la misma hora.

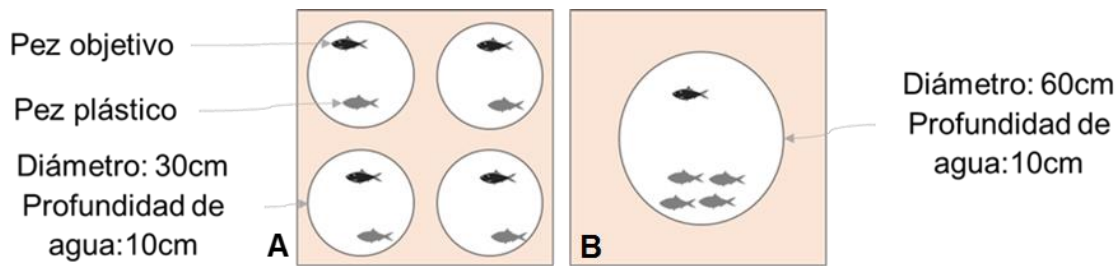


Figura 3-5 Representación esquemática de la prueba de residente-intruso (A) y la prueba de conducta gregaria (B).

Las pruebas de conducta gregaria se realizaron siguiendo las recomendaciones de Kowalko *et al.*, (2013b). Se utilizaron tanques circulares de 60 cm con 10 cm de profundidad (Figura 3-5.B). Se fabricó un cardumen artificial con 5 peces plastificados unidos entre sí por alambre, controlados por un sistema giratorio sobre el tanque de prueba, estos se hacían rotar a 25 rpm. Se realizaron videograbaciones de 10 minutos desde la parte superior para determinar los parámetros de DVC Y TGC, considerando la distancia entre el pez objetivo y los peces plastificados.

La prueba de nivel de conducta gregaria se realizó con 3 PS Y 3PC. Los organismos se introdujeron al tanque de prueba con el cardumen artificial funcionando y se permitió su aclimatación durante 10 minutos. Posteriormente se realizó la grabación a 10 cuadros por segundo durante 10 minutos. La prueba se realizó individualmente en un mismo día para los seis individuos. Se realizaron 3 repeticiones en 3 días diferentes.

El Seguimiento de las videograbaciones se realizó mediante el software idTracker, el cual divide el área de video en un plano cartesiano y marca la posición de cada organismo en cada cuadro de grabación (Pérez-Escudero *et al.*, 2014). Las matrices proporcionadas por el software idTracker fueron analizadas mediante el software de MATLAB, obteniendo las proporciones correspondientes.

La cuantificación de las diferentes conductas se realizó siguiendo la misma metodología conforme se fue requiriendo la medición de nuevos organismos a estudiar, por lo que se realizó cada vez que se requería comparar un grupo de organismos.

3.5. Determinación de marcadores genéticos mediante el perfil de expresión de genes candidatos

3.5.1. Secuencias candidatas a marcadores genéticos de conducta

Considerando la importancia y el efecto del sistema serotoninérgico en el comportamiento de agresividad de los peces (Höglund *et al.*, 2005; Elipot *et al.*, 2013, 2014a; Rétaux y Elipot 2013; Narvaes y Martins de Almeida 2014; Winberg y Thörnqvist 2016; Backström y Winberg 2017), se seleccionaron 5 genes candidatos que se han reportado con efectos sobre el nivel de agresividad, MAO (Elipot *et al.*, 2014a), TPH (Veroude *et al.*, 2016), receptor 5-HTA y el receptor 5-HTB (Takahashi *et al.*, 2014; Coccaro *et al.*, 2015) y SERT (Elipot *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017).

La secuencia exacta para cada gen candidato en *Astyanax mexicanus* no se encontraban disponibles por lo que se optó por un acercamiento bioinformático, utilizando el genoma completo disponible para esta especie (Malmstrøm *et al.*, 2017). Utilizando la plataforma del NCBI se buscó la secuencia correspondiente a cada uno de los mRNAs en el pez cebra, ya que este organismo presenta secuencias reportadas para todos los genes de interés (Agarwala *et al.*, 2018). Con cada secuencia de interés se realizó un Nucleotide BLAST en la plataforma NCBI (Morgulis *et al.*, 2008) sobre las secuencias de mRNA en *A. mexicanus* para encontrar una región homóloga. Con apoyo del Primer-BLAST del NCBI (Ye *et al.*, 2012) se diseñaron primers (cebadores, oligonucleótidos) específicos para estas secuencias en *A. mexicanus*, los cuales se muestran en la Tabla 3-1.

3.5.2. Extracción de RNA

Con el fin de identificar la expresión genética diferencial entre los niveles de agresividad en los organismos se seleccionaron individuos con un nivel alto, medio y bajo de agresividad. Se considero como nivel medio de agresividad a aquellos organismos que presentaron una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en el NAM promedio, superior a los PC pero menor a los PS con mayor número de ataques. Se seleccionaron 3 organismos de cada clase y se sacrificaron por choque térmico. Inmediatamente fueron diseccionados dividiendo las muestras

en cabeza, cuerpo y aletas, las cuales se sumergieron en nitrógeno para detener la descomposición y fueron conservadas a -20°C.

Tabla 3-1 Secuencias de primers (cebadores), temperatura de fusión (TM) y gen objetivo usados en el PCR.

Primer	Secuencia 5'-3'	Tm	Gen Objetivo	Referencia
MAOF MAOR	CCCCTCATATGGCAGCTCAG CAGTCGCACTTAAACCCCT	60°C	Monoamina Oxidasa A	XM_022685306.1
TPHF TPHR	ATTGTGGGAGATGCGCTGAA CCCTTGCATACCCAGTGACA	60°C	Triptófano hidroxilasa 1(variante 1, 2 y 3)	XM_007235178.3 XM_007235177.3 XM_007235176.3
HTAF HTAR	TGTCCACGTCGGTGCTTATC GGAGCCGATCAGGTAGTTGG	60°C	Receptor 5hidroxitriptamina 1A	XM_007256730.3
HTBF HTBR	AGCCCCATCACGAACTTGAG ACCGCAGTTCATTTGCACAC	60°C	Receptor 5hidroxitriptamina 1B	XM_007255244.3
SERTF SERTR	GACCATGTAGGAAGGCACACA TGTACCCGTTCTGGACCACT	60°C	Transportador homologo al pez cebra (variante 1 y 2)	XM_007236821.3 XM_007236820.2

El RNA total se extrajo de las muestras, empleando una modificación del método de extracción de Chomczynski y Sacchi (1987), como se planteó por Fuentes-Silva *et al.*, (2015).

Se colocan 100 mg de las muestras procedentes del cuerpo de cada ejemplar en tubos eppendorf de 2000µL y se agregan 1000 µL de Amortiguador (150 mM Tris base, 2% SDS, 100 mM EDTA, ajustado a pH 7.5 con ácido bórico saturado), agitando en vortex por 1 min. Se adicionan 100 µl de acetato de potasio 5M, pasan por 1 min en vortex. Posteriormente se le agregan 250 µl de etanol absoluto y se agitan en vortex por 1 min.

La extracción se realiza con 500 µl de Cloroformo-alcohol isoamílico, se agita en vortex por 1 min y se centrifuga a 12000 rpm durante 12 min a 4°C. Se recupera la fase acuosa y se coloca en un nuevo tubo de microcentrífuga. Se adicionan 500 µl de Cloroformo-alcohol isoamílico y se agita en vortex por 1 min con una posterior centrifugación a 12000 rpm durante 12 min a 4°C para recuperar la fase acusa en un nuevo tubo de microcentrífuga.

Se añade un volumen de cloruro de litio 8M igual a la fase acusa recuperada. Se precipita toda la noche a -20°C. Posterior a este tiempo se centrifuga

a 12000 rpm durante 12 min a 4°C u y se decantará para obtener el pellet. Finalmente se agregan 1000 µl de etanol al 70% y se elimina el exceso de etanol con una micropipeta y con un secado con aire para resuspender con 50 µl de agua destilada estéril.

La integridad de cada muestra de RNA se evaluó con una imagen en gel de agarosa al 1% en TAE 1x, colocado en una cámara de electroforesis (Mini-sub Cell GT, Bio Rad), con 250 ml de TAE 1x. Se cargaron 5 µl del RNA con Gel Red corriendo a 70v durante 60 min (fuente de poder Power Pac Basic, Bio Rad). El resultado se observó en el foto documentador utilizando el software Image Lab V6.0. La pureza de RNA se determinó por espectrofotometría con 1 µl de muestra usando el equipo NanoDrop 2000 Thermo Scientific.

3.5.3. Amplificación de las secuencias genéticas de los genes candidatos por RT-PCR

Para la amplificación de las secuencias de genes candidatos se utilizó el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, para obtener el cDNA, siguiendo la metodología descrita por el fabricante. En un tubo de 100 µl, se añaden una cantidad de RNA ajustada para cada muestra con el fin de obtener una concentración final de 25.6 ng/µl, 2 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl del oligo T18. Se calienta a 65°C 5 min utilizando el termociclador T100 de Bio Rad. Se enfría a temperatura ambiente y se añade 1 µl de la retrotranscriptasa, 1 µl de DnTP 10 mM, 2 µl agua libre de nucleasas y 4 µl del amortiguador 5x. Se calienta a 42 °C durante 60 min, después se eleva la temperatura a 72 °C durante 5 min y posteriormente se enfría a temperatura ambiente. Finalmente se almacena a -20°C.

Para obtener los productos de PCR se utilizó la Phusion Flash PCR Master Mix de Thermo Scientific, con la metodología descrita por el fabricante. En un tubo de 100 µl se añaden 5 µl de 2x Phusion Flash PCR Master Mix, 1 µl cDNA, 1 µl del oligonucleótido 3' 5', 1 µl del oligonucleótido 5' 3' y 2 µl de agua libre de nucleasas proporcionada por el kit. Se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el termociclador T100, Bio Rad con las siguientes condiciones: 98 °C durante 10 s ; 30 ciclos de 98 °C durante 1s; la temperatura de alineamiento dada por las características de los oligonucleótidos durante 5s; 72 °C durante 15s por cada 1 kb;

72 °C durante 1 min. Se enfría hasta 4 °C y se almacena a -20°C. Los productos de PCR se revisaron mediante electroforesis (Mini-sub Cell GT, Bio Rad), observando en el foto documentador utilizando el software Image Lab V6.0.

Las concentraciones iniciales de RNA fueron normalizadas, por lo que se realizó una aproximación del nivel de expresión como el porcentaje relativo de expresión dependiendo de la intensidad presentada en el gel de electroforesis, cuantificado mediante el software imageJ (Rueden *et al.*, 2017). A partir de la expresión diferencial se crearon perfiles de expresión para cada organismo seleccionado, comparando la expresión relativa al organismo con la mayor expresión para cada gen candidato. Se obtuvo la correlación de dichas secuencias con el NAM promedio de cada grupo de organismos, considerando una correlación mayor al 50% como un posible identificador de genes que podrían ser utilizados como marcadores genéticos. Adicionalmente se buscaron aquellas secuencias que estuvieran presentes en un linaje pero no se presentaran en los otros dos para de esta forma proponer un marcador a partir de los genes expresados que permita identificar los organismos agresivos de los no agresivos, similar a lo realizado en estudios previos (Tabor *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2008; Kloosterman *et al.*, 2010).

3.6. Análisis estadístico

Para comparar las diferentes características se utilizó una ANOVA, si se encontró diferencia estadística significativa se realizó una prueba de LSD. Grupos que no presenten normalidad se determinaron mediante una prueba de Shapiro-Wilk y se analizaron usando una prueba de Kruskal Wallis. Todas las pruebas estadísticas fueron calculadas utilizando el software Statgraphics Routine Centurion XV ver 15.2.06. El valor de alfa se estableció en 0.05. La información se presentó como medias y errores estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Sistema de cultivo para poblaciones de *Astyanax mexicanus*

4.1.1. Sistema en rack

El sistema de cultivo se fabricó siguiendo los puntos mencionados en la metodología para el correcto mantenimiento de los peces de cueva (PC) y los peces de superficie (PS). La elaboración de la estructura de soporte se realizó en acero inoxidable (Figura 4-1). Todas las tuberías de entrada y salida se instalaron sobre esta estructura central que a su vez funciona como la base para mantener los estanques en cada nivel. Los tanques se elaboraron en acrílico para facilitar su manejo aumentando su resistencia, ya que gracias a su sistema de drenado es posible retirarlos aun cuando estos se encuentren con organismos vivos, en especial los tanques de 20 L.

La tubería de entrada se fabricó utilizando tubo de PVC hidráulico de 1 pulgada desde la bomba (Figura 4-2.A), con reducciones a ½ pulgada en cada tanque y la instalación de válvulas para el control del flujo y la conexión de mangueras de ¼ para suministrar el agua (Figura 4-2.A,B). La tubería de salida consistió de tubo de PVC hidráulico de ½ pulgada para los rebosaderos (Figura 4-3.B), se realizó una adaptación para permitir el control del nivel de agua al cambiar la altura del tubo del rebosadero, también se utilizó un tubo de 1 ½ pulgada para propiciar que el agua se tomara del fondo del tanque. Las salidas de cada tanque se conectan a la tubería perforada de desagüe de 2 pulgadas (Figura 4-3.A,C). Finalmente, el desagüe desemboca en el sistema de filtración (Figura 4-3.D).

El sistema de filtración consta de un tanque con divisiones dentro del mismo que facilitan el flujo del agua a través de los materiales filtrantes (Figura 4-4). En el filtro mecánico se utilizó esponja de acuario recubierta con carbón activado para retener las partículas sólidas en el agua, a la vez que se comienza con la filtración biológica y química. El agua circula por la parte inferior hacia el filtro biológico de cerámica para continuar su filtración química con carbón activado y regresar mediante la bomba de recirculación a los tanques. Dentro del tanque de filtración se encuentra el termostato encargado de realizar el aumento de temperatura y se realiza el bombeo de agua independiente hacia la lámpara UV y el chiller externo.



Figura 4-1 Sistema en rack con cubierta para establecer fotoperiodo.



Figura 4-2 Sistema de entrada de agua. Bomba de agua (A), válvula de llegada a tanque (B) y salida con conexión de manguera (C).

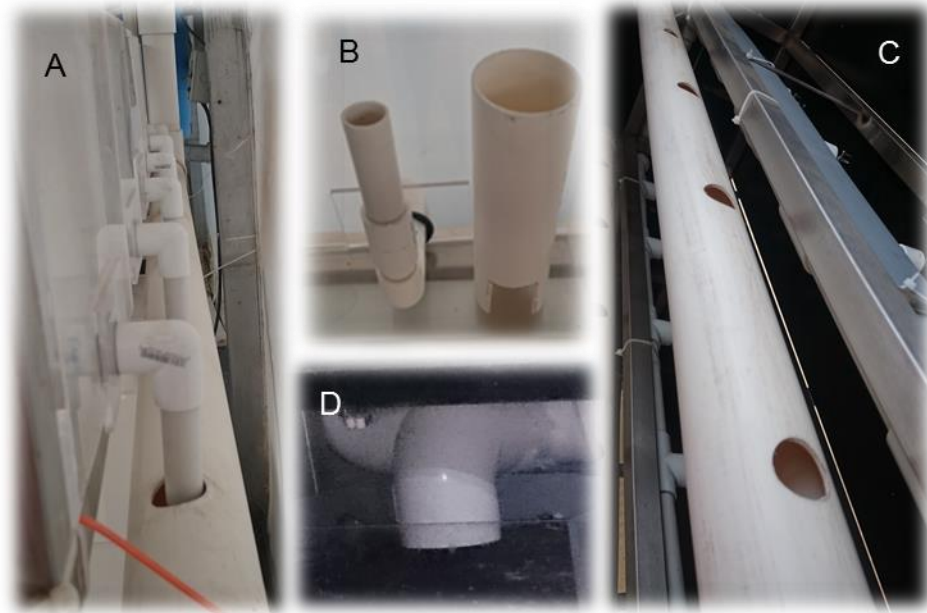


Figura 4-3 Sistema de salida de agua. Conexión tanque-tubería de desagüe (A), tubería del rebosadero dentro del tanque (B), tubería de desagüe con perforaciones (C) y Salida al sistema de filtración (D).



Figura 4-4 Tanque de filtración del sistema en rack.

4.1.2. Pruebas de funcionamiento para mantenimiento

Las recomendaciones existentes para el cultivo de *Astyanax mexicanus* indican el mantener temperaturas de alrededor de 22°C para los PC y de 26°C para los PS con una calidad de agua adecuada para peces tropicales. La temperatura es un parámetro importante para el cultivo de *A. mexicanus*, requiriendo diferentes rangos para permitir la reproducción de PC Y PS, por esta razón se realizaron dos pruebas independientes para observar la regulación de la temperatura. En la Tabla 4-1 se muestran los valores obtenidos de calidad de agua a una temperatura de

26°C y en la Tabla 4-2 para 22°C. Se observa que los valores se encuentran dentro del rango adecuado para el cultivo y mantenimiento de peces tropicales en ambas temperaturas (Timmons *et al.*, 2010; Lawrence y Mason, 2012), indicando que el filtro está cumpliendo correctamente con su función. Ya que no existe una diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre los valores obtenidos en el tanque de filtración y en el tanque de cultivo se considera que la recirculación de agua está cumpliendo su función, permitiendo otorgar una calidad de agua adecuada a todo el sistema.

Tabla 4-1 Calidad de agua del sistema en rack a 26°C. Promedio de 7 días \pm desviación estándar, no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el filtro y el tanque de cultivo.

Parámetros	Filtro	Tanque de cultivo
Oxígeno disuelto (O ₂ mgL ⁻¹)	7.6 \pm 0.3	7.4 \pm 0.2
pH	7.4 \pm 0.2	7.3 \pm 0.1
Conductividad (μ S/cm)	540.2 \pm 6.4	540.5 \pm 5.1
(NH ₄ ⁺ mg L ⁻¹)	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
Temperatura (°C)	26 \pm 0.38	25.9 \pm 0.41

Tabla 4-2 Calidad de agua del sistema en rack a 22°C. Promedio de 7 días \pm desviación estándar, no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre el filtro y el tanque de cultivo.

Parámetros	Filtro	Tanque de cultivo
Oxígeno disuelto (O ₂ mgL ⁻¹)	8.2 \pm 0.3	8 \pm 0.3
pH	7.3 \pm 0.2	7.3 \pm 0.1
Conductividad (μ S/cm)	554.5 \pm 7.9	554.13 \pm 8.4
(NH ₄ ⁺ mg L ⁻¹)	0.03 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
Temperatura (°C)	22.06 \pm 0.49	22.22 \pm 0.5

Las temperaturas obtenidas para el tanque de filtración y el tanque de cultivo regulado a 26 °C y a 22°C se observan en la Figura 4-5. No se presentó una diferencia estadística significativa a ninguna hora del día para ambas temperaturas. Se considera que el sistema de enfriamiento y calentamiento es adecuado para el mantenimiento de las condiciones buscadas.

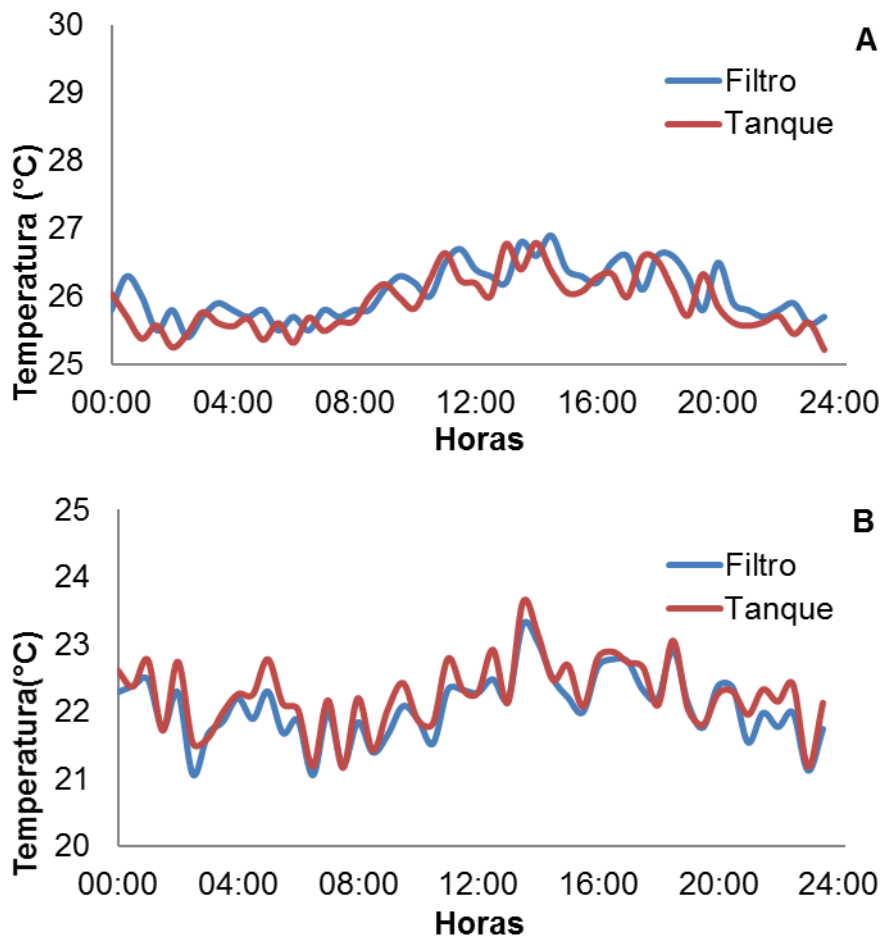


Figura 4-5 Patrón de temperatura promedio del agua durante un ciclo de 24 horas en el filtro y un tanque de cultivo a una temperatura de 26°C (A) y 22 °C (B). No existe diferencia ($p > 0.05$) entre los tanques a una misma temperatura.

4.1.1. Pruebas de funcionamiento para la inducción de reproducción

Para otorgar un estímulo adecuado que induzca el desove de las poblaciones de *A. mexicanus* se requirió que el sistema tuviera la capacidad de aumentar la temperatura. La grafica de la variación de temperatura al regular un cambio de 26°C a 22°C durante la noche, regresando a los 26°C al día siguiente, se observa en la Figura 4-6.A y el cambio de 22°C a 26°C regresando a 22°C se observa en la Figura 4-6.B. No existió diferencia significativa entre los valores obtenidos del filtro y el tanque por lo que se considera que el control de temperatura es adecuado. El sistema logró realizar los cambios de temperatura llegando a los valores objetivo durante una noche, demostrando así su capacidad de proporcionar

el estímulo reportado en la bibliografía para inducir el desove de *A. mexicanus* (Borowsky, 2008b; Elipot *et al.*, 2014b).

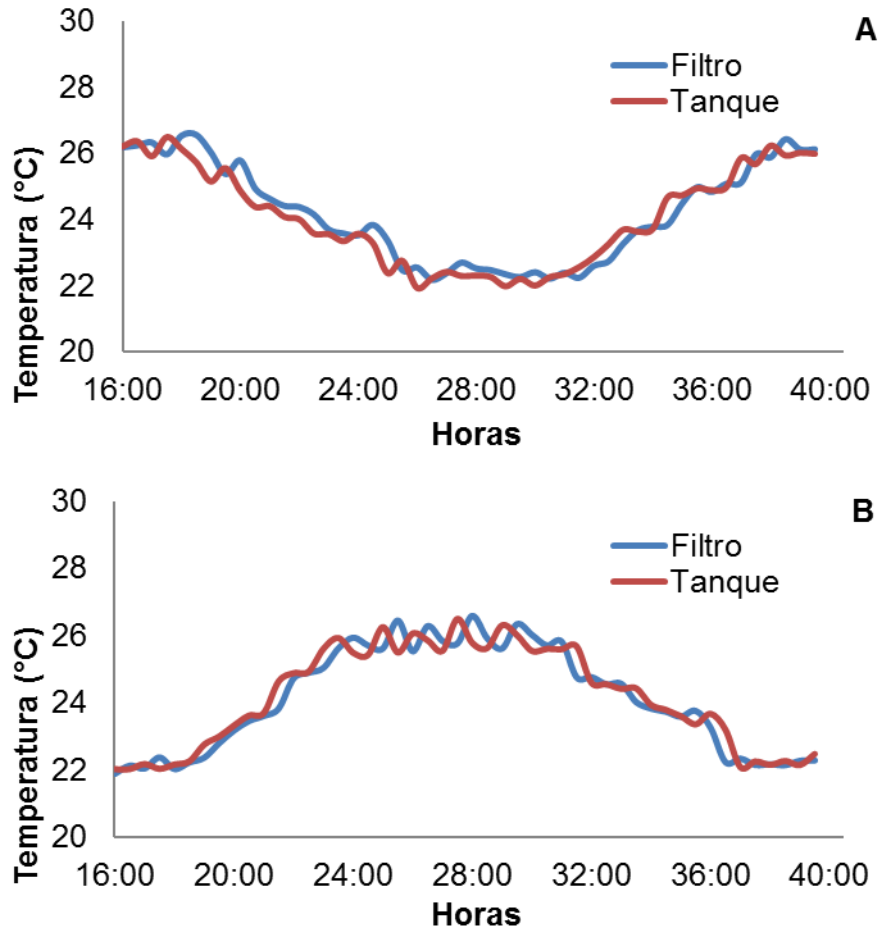


Figura 4-6 Patrón de temperaturas promedio durante un ciclo de 24 horas para el filtro y un tanque de cultivo durante la disminución (A) y el aumento (B) de temperatura a lo largo de una noche. No existió diferencia ($p>0.05$) entre los tanques.

4.2. Linajes de *Astyanax mexicanus*

4.2.1. Captura de poblaciones silvestres

Se realizó la exploración de 3 cuevas diferentes en la zona de la Sierra del Abra, San Luís Potosí Figura 4-7. Las cuevas visitadas fueron correspondientes a la zona de Micos, Chica y Sabinos. Los parámetros observados en las diferentes poblaciones se muestran en la Tabla 4-3 Los valores se encuentran dentro del rango

proporcionado por el sistema de cultivo en rack, por lo que se consideró que sería adecuado el traslado de organismos de estas poblaciones al laboratorio. Debido a que se buscaban poblaciones de PC lo más alejadas a los PS, se consideró el utilizar la población de Sabinos para realizar los estudios, ya que como se reporta en la bibliografía esta población se encuentra alejada de PS (Ornelas-García y Pedraza-Lara 2016).



Figura 4-7 Mapa de la ubicación aproximada, en la zona de la Sierra del Abra San Luis Potosí, de las cuevas de Chica (A), Micos (B) y Sabinos (C).

Se realizó la captura de 30 PC de Sabinos, con una supervivencia a los 15 días del 80%. Los peces aceptaron de forma inmediata el alimento comercial para pe tropical. Se observa que Intentan alimentarse de cualquier objeto que entra al tanque.

Tabla 4-3 Parámetros ambientales registrados al momento de la exploración o captura.

	Fecha:	Temperatura °C	pH	Salinidad µS/cm	Dureza mg/L CaCO ₃	Profundidad m
Sabinos	22/04/15	24.8	7.7	442	203	1
Sabinos	15/04/16	24.6	8.02	375	200	1.2
Chica	23/04/15	26.8	6.9	675	814	3.2
Micos	24/04/15	21.4	7.4	461	383	0.6
Superficie	15/10/15	24.8	7.09	1057	580	1.5

La captura de PS se realizó en los manantiales del poblado de Concá. Los valores ambientales observados se muestran en la Tabla 4-3. Se capturaron 30 individuos con una supervivencia a 15 días del 70%. La primera semana en cautiverio los peces no consumieron el alimento comercial para peces tropicales. Debido a la alta agresividad no es posible mantener individuos de esta población con grupos reducidos en un tanque de menor tamaño.

La diferencia en la supervivencia de ambas poblaciones muestra que la población de cueva tolera mejor los cambios ambientales, como era de esperar de un organismo adaptado a la vida en cuevas.

4.2.2. Reproducción de poblaciones silvestres

La reproducción por desove libre se cuantificó en 10 parejas considerando tres eventos de inducción mediante cambios de temperatura con un descanso de 15 días entre cada prueba. En los PS al reducir el flujo en el sistema de cultivo y realizar la inducción mediante cambios de temperatura se obtuvieron desoves en el 26±5% de las parejas (Figura 4-8). La población de cueva presentó un porcentaje menor de desove con el 6±5% de las parejas. Este resultado es de esperar ya que se ha reportado una mayor dificultad en la reproducción de las poblaciones de PC en comparación con PS (Huppopp y Wilkens 2009; Elipot *et al.*, 2014b). De los desoves logrados en PS se obtuvieron en promedio 68±25 huevos por puesta,

mientras que en el desove de PC se obtuvieron 33 ± 30 huevos. Los valores se encuentran por debajo de lo reportado en la literatura, probablemente por tratarse de organismos silvestres ya que lo reportado en la literatura es para generaciones nacidas en cautiverio. De estos desoves solo se obtuvieron 168 eclosiones para PS y 29 para PC representando un porcentaje de viabilidad del $29\pm2\%$ en PS y $16\pm27\%$ en PC. La alta variabilidad presentada en PC se debe a que únicamente se obtuvo un desove viable dentro de las 3 pruebas de inducción mediada por temperatura. Los alevines obtenidos se mantuvieron en tanques de 30 L separados por población.

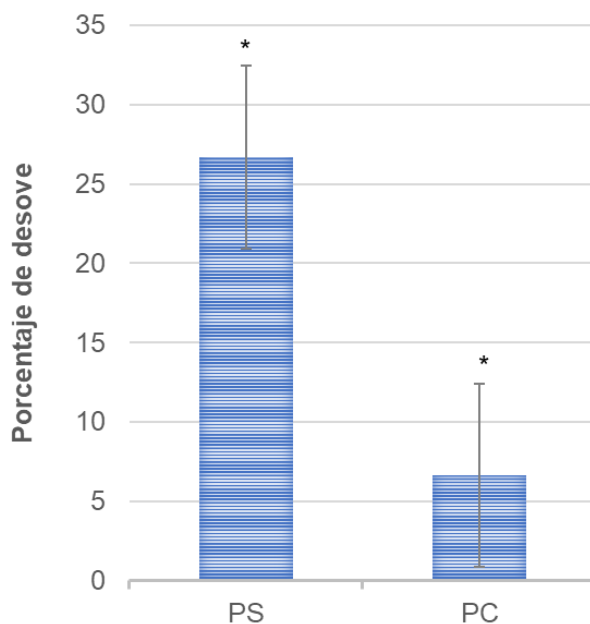


Figura 4-8 Porcentaje de desove presentado en peces de superficie (PS) y peces de cueva (PC) posterior a la inducción por temperatura. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 inducciones de temperatura de 10 parejas. * indica diferencia estadística significativa ($p<0.05$).

4.3. Determinación de niveles de agresividad de *Astyanax mexicanus*

4.3.1. Cuantificación del nivel de agresividad

Los valores obtenidos del NAM de la prueba de residente-intruso modificada con peces plastificados se observa en la Figura 4-9. Los valores obtenidos se aproximan a los reportados en estudios previos, donde los PS

presentaron un NAM de más de 16, mientras que las PC de menos de 2 (Elipot *et al.*, 2013). Los valores obtenidos no pueden compararse directamente con los estudios previos, ya que las conductas son comportamientos complejos con una alta variabilidad. A pesar de esto se observa a partir de los resultados obtenidos que utilizando el promedio del NAM de un mismo pez en tres mediciones diferentes es posible identificar con una significancia estadística diferencias entre PC y PS, pero adicionalmente se detectan niveles de agresividad dentro de una misma población. Esta metodología permite seleccionar individuos más o menos agresivos para su posterior estudio o reproducción. Si se compara el nivel promedio de 10 individuos analizados para cada población (Figura 4-10), con los valores obtenidos en trabajos previos se observa que, a pesar de tratarse de condiciones experimentales muy diferentes, no existe una diferencia significativa entre los estudios. Esto reafirma el supuesto de que las poblaciones de superficie son altamente agresivas, mientras que las poblaciones de cueva no presentan un grado de agresividad considerable.

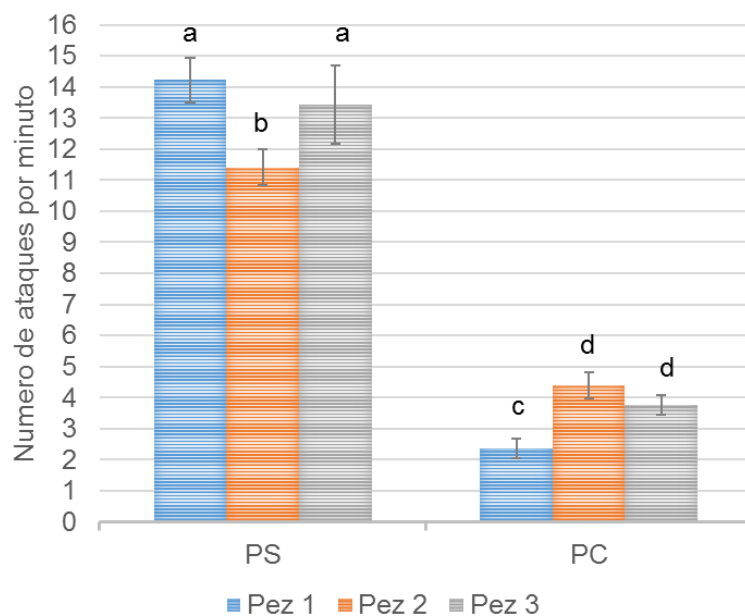


Figura 4-9 Número de ataques por minuto de 3 peces de superficie (PS) y 3 Peces de cueva (PC). Se muestra el promedio y su desviación estándar. a, b, c y d marcan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

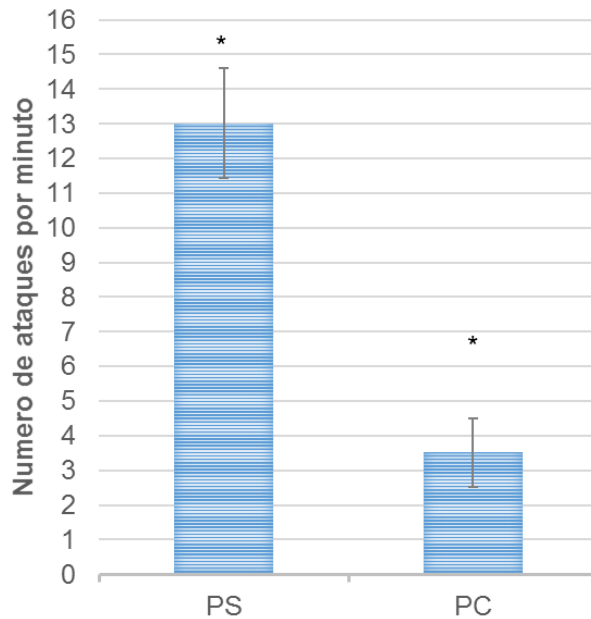


Figura 4-10 Número de ataques por minuto en poblaciones de cueva (PC) y de superficie (PS) de *Astyanax mexicanus*. Se muestra el promedio y desviación estándar de n=10 para PC Y PS. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

La conducta gregaria está relacionada con la interacción social que poseen las diferentes poblaciones, por lo que se requiere su cuantificación para realizar una clasificación de las conductas favorables para conducta del individuo. Se cuantificaron dos parámetros de conducta gregaria, comenzando con la TGC en donde se observó que los peces presentan una alta variabilidad al repetir la prueba Figura 4-11 y no fue posible identificar individuos más o menos gregarios a partir de esta prueba. Aun así, si se encontró una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre PC Y PS, por lo que a pesar de que la prueba no sirve para identificar de forma detallada a los individuos, si se pueden delimitar grupos gregarios y no gregarios. Al aumentar el número de individuos estudiados para su TGC Figura 4-12 se comprueba que existe una diferencia significativa entre ambas poblaciones.

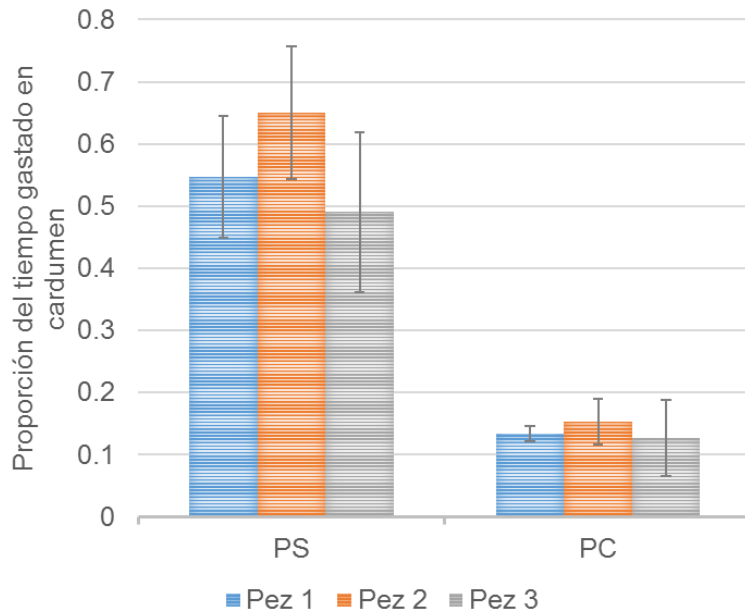


Figura 4-11 Proporción de tiempo gastado en cardumen para 3 peces de superficie (PS) y 3 Peces de cueva (PC). Se muestra el promedio y su desviación estándar. No existe una diferencia significativa entre individuos de la misma población ($p > 0.05$). Existe diferencia significativa entre PC y PS ($p < 0.05$).

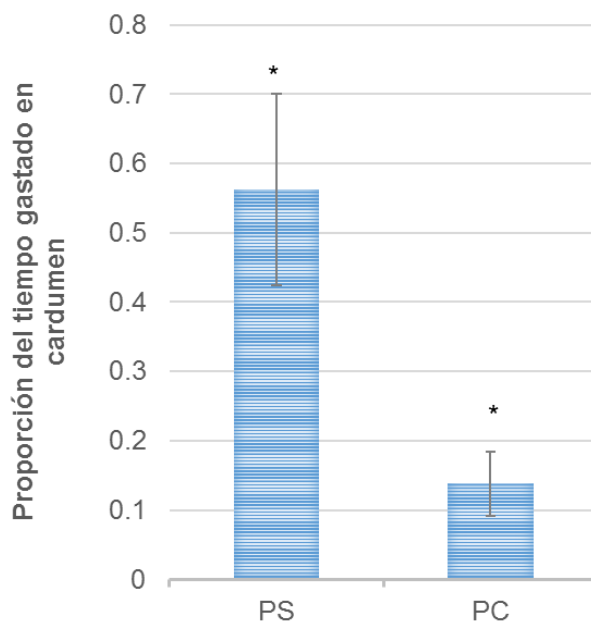


Figura 4-12 Proporción del tiempo gastado en cardumen en poblaciones de cueva (PC) y de superficie (PS) de *Astyanax mexicanus*. Se muestra el promedio y desviación estándar de $n=10$ para PC Y PS. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

El segundo parámetro cuantificado fue la DVC, que nos indica la tolerancia que tiene el individuo a estar en cercanía con otros organismos. Igual que con la TGC no se encontró diferencia estadística significativa entre individuos de la misma población Figura 4-13, pero claramente se distingue que los PS tienden a mantenerse a distancias menores entre organismos Figura 4-14. Ya que no se distingue una diferencia en nivel de conducta gregaria dentro de una misma población no será posible relacionar directamente estos parámetros con el nivel de agresividad de un individuo.

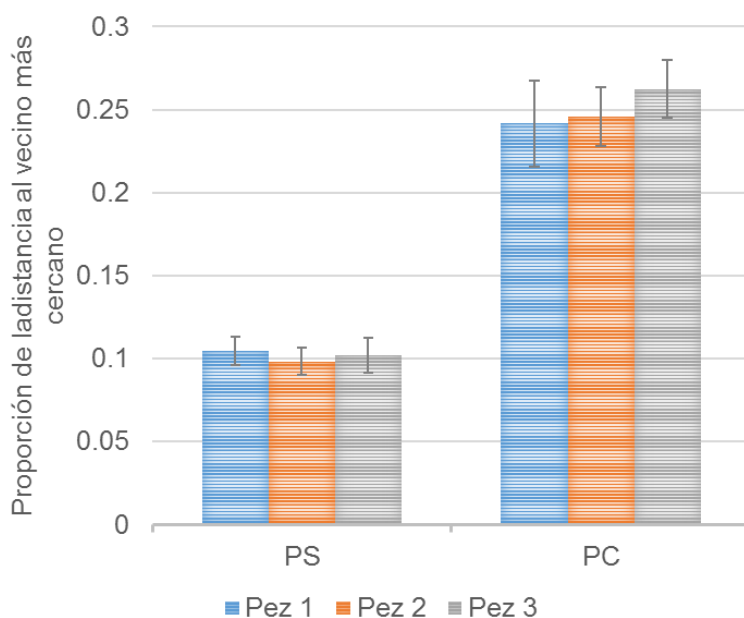


Figura 4-13 Proporción de la distancia al vecino más cercano para 3 peces de superficie (PS) y 3 Peces de cueva (PC). Se muestra el promedio y su desviación estándar. No existe una diferencia significativa entre individuos de la misma población ($p > 0.05$). Existe diferencia significativa entre PC y PS ($p < 0.05$).

Los PS son altamente sociales, con interacciones tan complejas que a bajas densidades presentan comportamientos agresivos y a densidades mayores tienden a formar cardúmenes organizados. Esto se debe en parte a que los PS son organismos jerárquicos mientras que los PC no muestran signos de interacción social (Hinaux *et al.*, 2016). Esta complejidad genera una alta dificultad al momento de clasificar los niveles conductuales de los organismos, pero al observar los

resultados obtenidos se propuso el utilizar el NAM como el parámetro para realizar la clasificación conductual de los organismos durante su selección. Los valores TGC y DVC sirven como parámetros confirmatorios del nivel de interacción social, sin permitir una clasificación fina dentro de las poblaciones.

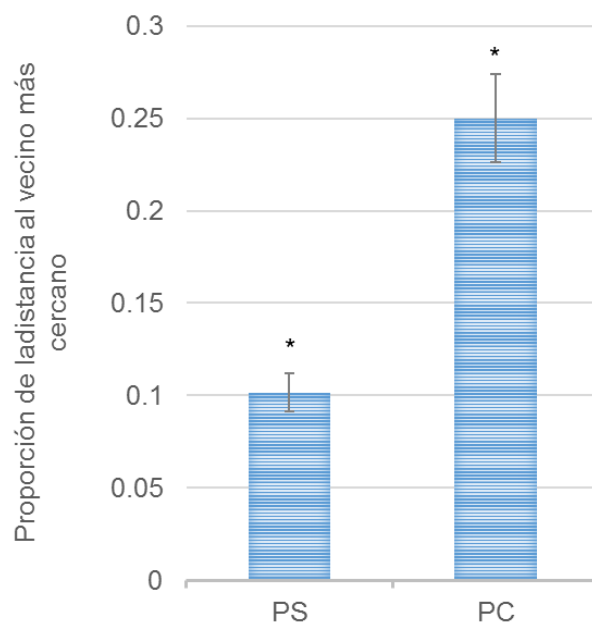


Figura 4-14 Proporción de la distancia al vecino más cercano en poblaciones de cueva (PC) y de superficie (PS) de *Astyanax mexicanus*. Se muestra el promedio y desviación estándar de n=10 para PC Y PS. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

4.4. Determinación de marcadores genéticos mediante el perfil de expresión de genes candidatos

Para la selección de peces con agresividad alta (PSA), peces con agresividad media (PSM) y peces no agresivos (PCN) se determinó el NAM en 12 PS y 6 PC, de los cuales se buscaron aquellos que presentaban diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) y se seleccionaron 3 PS con un nivel más alto de NAM, 3 PS con un nivel medio de NAM y 3 PC no agresivos (Figura 4-15), los PC se consideraron como organismos no agresivos tomando en cuenta lo reportado en la literatura (Rétaux y Elipot 2013).

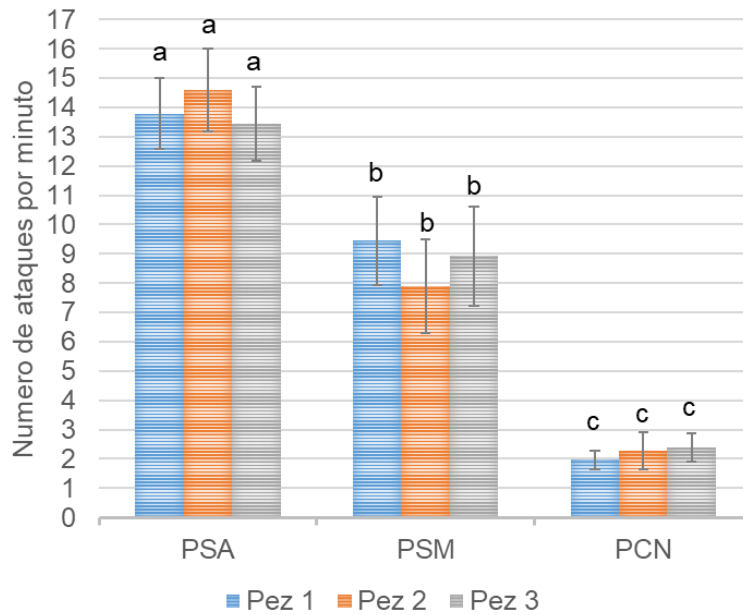


Figura 4-15 Número de ataques por minuto de 3 peces de superficie con agresividad alta (PSA), 3 peces de superficie con agresividad media (PSM) y 3 peces de cueva no agresivos (PCN). Se muestra el promedio y su desviación estándar. a, b y c marcan una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

4.4.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó siguiendo la metodología descrita y se obtuvieron las concentraciones mostradas en la Tabla 4-4. Las concentraciones obtenidas son suficientes para realizar la RT-PCR, por lo que se consideraron adecuadas para el experimento.

Tabla 4-4 Concentración del RNA extraído de las muestras de 3 peces de superficie con agresividad alta (PSA), 3 peces de superficie con agresividad media (PSM) y 3 peces de cueva no agresivos (PCN).

Organismo	Concentración de muestra (ng/μl)
PSA1	25.6
PSA2	59.8
PSA3	117.3
PSM1	90.4
PSM2	69.6
PSM3	75.1
PCN1	294.6
PCN2	31.6
PCN3	102.5

4.4.2. Amplificación de las secuencias genéticas de los genes candidatos por RT-PCR

El porcentaje de expresión relativa de los genes candidatos se muestra en la Figura 4-16. Estos valores no pueden ser comparados con otros estudios ya que dependen directamente de la imagen de captura, pero permiten observar la diferencia de expresión dentro de un mismo gel, por lo que es posible diferenciar el nivel de expresión de un mismo gen entre los organismos estudiados (Rueden *et al.*, 2017). Los perfiles de expresión en PSA, PSM y PCN se obtuvieron a partir de los porcentajes relativos de expresión y se muestran en la Tabla 4-5. Los primers propuestos para MAO no amplificaron correctamente, esto pudo deberse a estructuras secundarias no detectadas durante el diseño de las secuencias, como se ha reportado previamente, el diseño de primers depende tanto de la secuencia objetivo como de las interacciones moleculares que ocurren dentro del organismo

(Singh y Kumar 2001; Yuryev 2007), por lo que sería necesario proponer una variedad de primers para la misma secuencia con la finalidad de garantizar la detección del gen de interés.

A partir de los perfiles de expresión se puede destacar la participación de SERT y HTB en la diferenciación de organismos agresivos y no agresivos con una correlación de -0.9 y -0.85 respectivamente. El aumento de la expresión de SERT favorece la disminución de la agresividad, su participación ya se había reconocido en mamíferos (Veroude *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017), pero al contrario a lo observado en *A. mexicanus*, una reducción en SERT disminuyó la agresividad en ratones (Heiming *et al.*, 2013; Veroude *et al.*, 2016), comportamiento que también se observó en el pez cebra, donde se presentó una sobreexpresión de SERT en los organismos agresivos (Filby *et al.*, 2010). Por otra parte ya se había reportado que una disminución en HTB en mamíferos aumenta la agresividad (Banlaki *et al.*, 2015), como lo observamos en este estudio. Para el caso de HTA la diferencia entre los organismos no fue relevante, a pesar de que se esperaba un incremento en los PSA (Filby *et al.*, 2010). Los valores obtenidos de TPH no concuerdan con lo observado en la literatura ya que el pez cebra reportó una sobreexpresión de TPH en los peces dominantes (Filby *et al.*, 2010) igual que lo observado en mamíferos (Alekseyenko *et al.*, 2010). Es importante destacar que los peces no agresivos presentaban un nivel bajo de TPH conforme a la literatura, pero este nivel no muestra una diferencia con PSA. Por otra parte los PSM presentaron una expresión mayor de TPH por lo que este se podría considerar como un candidato a marcador de expresión en peces no dominantes, que es lo ideal para el cultivo en la acuicultura. Estas alteraciones pueden deberse a modificaciones epigenéticas de larga duración a causa de las condiciones ambientales, lo que generaría un comportamiento agresivo en las etapas adultas del organismo, pero se debe considerar que la susceptibilidad a estas mutaciones depende del perfil genético del organismo (Philibert *et al.*, 2007; van IJzendoorn *et al.*, 2010; Kinnally *et al.*, 2011; Barker *et al.*, 2013).

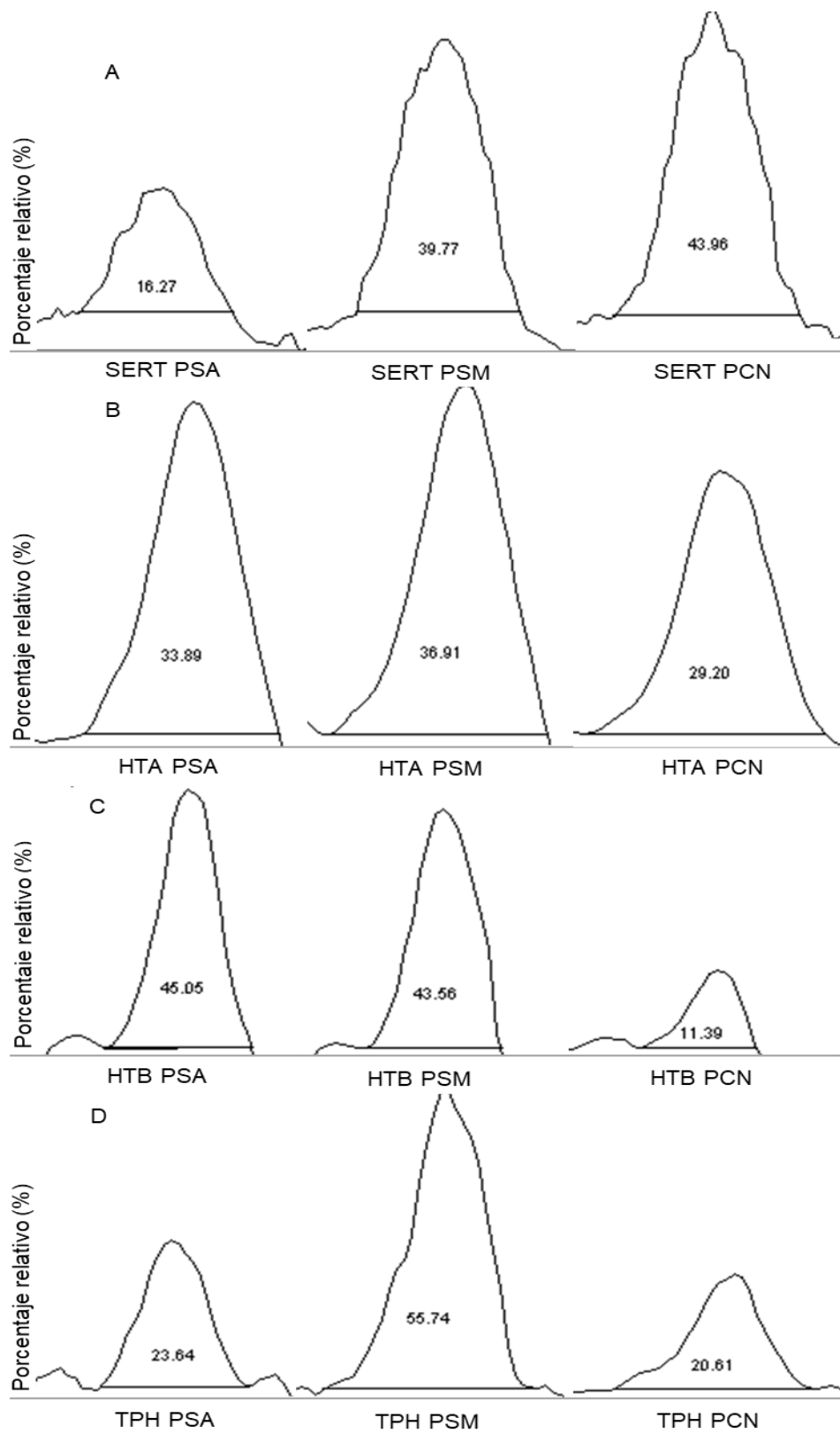


Figura 4-16 Porcentaje relativo de expresión de los genes candidatos seleccionados en peces de superficie con agresividad alta (PSA), peces de superficie con agresividad media (PSM) y peces de cueva no agresivos (PCN).

Tabla 4-5 Perfil de expresión de genes candidatos para el comportamiento de agresividad en peces de superficie con agresividad alta (PSA), peces de superficie con agresividad media (PSM) y peces de cueva no agresivos (PCN). Se muestra la expresión relativa respecto al organismo con mayor expresión para cada gen candidato y su correlación.

Organismo	SERT	TPH	HTA	HTB
PSA	0.37	0.42	0.91	0.25
PSM	0.90	1	1	0.96
PCN	1	0.36	0.79	1
Correlación:	-0.9	.14	0.65	-0.85

SERT y HTB son los genes candidatos a ser utilizados como marcadores genéticos para la disminución de la agresividad en *Astyanax mexicanus*, buscando una reducción en los mismos durante la selección genética. Cabe destacar que estos genes tienen un efecto en el comportamiento de organismos adultos desde las primeras etapas de vida, como se ha reportado en mamíferos donde cambios en los niveles del sistema serotoninérgico durante las primeras etapas de vida generan alteraciones neuronales durante el resto de vida del organismo (Dayer 2014).

5. CONCLUSIÓN

El sistema de cultivo diseñado en este trabajo es adecuado para el mantenimiento de *Astyanax mexicanus*. Este tiene la capacidad de realizar la inducción de desove tanto en poblaciones de cueva como en poblaciones de superficie, facilitando el manejo de los organismos.

Las poblaciones de cuevas son más resistentes que las poblaciones de superficie, adaptándose con mayor facilidad a las condiciones en cautiverio.

La cuantificación de la conducta depende de múltiples factores, incluyendo las condiciones ambientales y las interacciones sociales, por lo que la cuantificación del número de ataques mediante una prueba de residente-intruso utilizando un pez plastificado facilita la identificación de diferentes grados de agresividad.

La expresión diferencial de los genes candidatos propuestos en *A. mexicanus* permitieron la identificación de dos genes marcadores, SERT Y HTB para la agresividad en esta especie, por lo que se acepta la hipótesis propuesta. Debido al tamaño de la muestra utilizada en este estudio se requerirá comprobar a largo plazo y con una población mayor la efectividad de los marcadores encontrados en este proyecto.

Astyanax mexicanus presenta las características ideales para convertirse en un modelo de estudio de agresividad no solo de especies acuícolas, sino que además, podría aportar información valiosa para continuar con la búsqueda de soluciones para interacciones agresivas patológicas en el ser humano, sumándose a los modelos de aves, de roedores, de *Drosophila* y el pez cebra que actualmente son utilizados con este fin (Veroude *et al.*, 2016). Adicionalmente es importante destacar que los estudios en el sistema serotoninérgico pueden tener otras aplicaciones de importancia para la acuicultura ya que la Serotonina disminuye el consumo de alimentos en una forma dependiente de la dosis (Ortega *et al.*, 2013; He *et al.*, 2018), por lo que se tendrán que realizar estudios considerando el impacto que puede enfrentar una población al ser seleccionada por las interacciones del sistema serotoninérgico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwala, R., T. Barrett, J. Beck, D. A. Benson, C. Bollin, E. Bolton, ..., y K. Zbicz. 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 46(D1):D8–D13.
- Aguirre-Becerra, H., y G. M. Soto-Zarazúa. 2013. Diseño e implementación de un sistema de incubación de renacuajos de rana toro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) basados en el control de intensidad luminosa y temperatura. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.
- Albertson, R. C., W. Cresko, H. W. 3rd Detrich, y J. H. Postlethwait. 2009. Evolutionary mutant models for human disease. *Trends in Genetics* 25(2):74–81.
- Alcazar, R. M., A. T. Hilliard, L. Becker, M. Bernaba, y R. D. Fernald. 2014. Brains over Brawn: Experience overcomes a size disadvantage in fish social hierarchies. *The Journal of experimental biology* 217(9):1462–1468.
- Alekseyenko, O. V., C. Lee, y E. A. Kravitz. 2010. Targeted Manipulation of Serotonergic Neurotransmission Affects the Escalation of Aggression in Adult Male *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 5(5):e10806.
- Backström, T., y S. Winberg. 2017. Serotonin Coordinates Responses to Social Stress—What We Can Learn from Fish. *Frontiers in Neuroscience* 11.
- Banlaki, Z., Z. Elek, T. Nanasi, A. Szekely, Z. Nemoda, M. Sasvari-Szekely, y Z. Ronai. 2015. Polymorphism in the Serotonin Receptor 2a (HTR2A) Gene as Possible Predisposal Factor for Aggressive Traits. *PLOS ONE* 10(2):e0117792.
- Baranski, M., T. Moen, y D. I. Vage. 2010. Mapping of Quantitative Trait Loci for Flesh Colour and Growth Traits in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Genet. Sel. Evol.* 42(1):17.
- Barreto, R., G. Volpato, C. de B. Faturi, P. C. Giaquinto, E. G. de Freitas, y M. F. de Castilho. 2009. Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 42(2):109–118.
- Barreto, T. N., C. N. P. Boscolo, y E. Gonçalves-de-Freitas. 2015. Homogeneously sized groups increase aggressive interaction and affect social stress in Thai strain Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine & Freshwater Behaviour &*

Physiology 48(5):309–318.

- Batzina, A., C. Dalla, Z. Papadopoulou-Daifoti, y N. Karakatsouli. 2014. Effects of environmental enrichment on growth, aggressive behaviour and brain monoamines of gilthead seabream *Sparus aurata* reared under different social conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 169:25–32.
- Beale, A., C. Guibal, T. K. Tamai, L. Klotz, S. Cowen, E. Peyric, V. H. Reynoso, Y. Yamamoto, y D. Whitmore. 2013. Circadian rhythms in Mexican blind cavefish *Astyanax mexicanus* in the lab and in the field. *Nature communications* 4:2769.
- Bell, A. M., T. Backström, F. A. Huntingford, T. G. Pottinger, y S. Winberg. 2007. Variable neuroendocrine responses to ecologically-relevant challenges in sticklebacks. *Physiology and Behavior* 91(1):15–25.
- Bellipanni, G., E. Rink, y L. Bally-Cuif. 2002. Cloning of two tryptophan hydroxylase genes expressed in the diencephalon of the developing zebrafish brain. *Mechanisms of Development* 119:S215–S220.
- Bhattacharyya, S., S. Puri, R. Miledi, y M. M. Panicker. 2002. Internalization and recycling of 5-HT_{2A} receptors activated by serotonin and protein kinase C-mediated mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(22):14470–14475.
- Bibliowicz, J., A. Alié, L. Espinasa, M. Yoshizawa, M. Blin, H. Hinaux, L. Legendre, S. Père, y S. Rétaux. 2013a. Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterráneo cave. *EvoDevo* 4:25.
- Bibliowicz, J., A. Alié, L. Espinasa, M. Yoshizawa, M. Blin, H. Hinaux, L. Legendre, S. Père, y S. Rétaux. 2013b. Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterráneo cave. *EvoDevo* 4(March):25.
- Bierbach, D., M. Klein, V. Saßmannshausen, I. Schlupp, R. Riesch, J. Parzefall, y M. Plath. 2012. Divergent evolution of male aggressive behaviour: another reproductive isolation barrier in extremophile poeciliid fishes? *International journal of evolutionary biology* 2012:148745.
- de Boer, S. F., B. Olivier, J. Veening, y J. M. Koolhaas. 2015. The neurobiology of

- offensive aggression: Revealing a modular view. *Physiology & Behavior* 146:111–127.
- Borgese, E. M. 1980. *Seafarm: the story of aquaculture*, 1st edición. H. N. Abrams, New York.
- Borowsky, R. 2008a. *Astyanax mexicanus*, the Blind Mexican Cave Fish: A Model for Studies in Development and Morphology. *Cold Spring Harbor Protocols* 3(11):1001–1005.
- Borowsky, R. 2008b. Breeding *Astyanax mexicanus* through natural spawning. *Cold Spring Harbor Protocols* 3(11).
- Borowsky, R. 2008c. Handling *Astyanax mexicanus* eggs and fry. *Cold Spring Harbor Protocols* 3(11):1–3.
- Borowsky, R. 2008d. Determining the sex of adult *Astyanax mexicanus*. *Cold Spring Harbor Protocols* 3(11).
- Bortolato, M., K. Chen, y J. C. Shih. 2010. The Degradation of Serotonin: Role of MAO. Páginas 203–218.
- Bovenkerk, B., y F. L. B. Meijboom. 2013. Fish Welfare in Aquaculture: Explicating the Chain of Interactions Between Science and Ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 26(1):41–61.
- Braithwaite, V. A., y T. Burt de Perera. 2006. Short-range orientation in fish: How fish map space. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 39(1):37–47.
- Brand, M., M. Granato, y C. Nüsslein-Volhard. 2002. Keeping and raising zebrafish. Páginas 7–37 en C. Nüsslein-Volhard y R. Dahm, editores. *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford university press, United States.
- Burt de Perera, T. 2004a. Spatial parameters encoded in the spatial map of the blind Mexican cave fish, *Astyanax fasciatus*. *Animal Behaviour* 68(2):291–295.
- Burt de Perera, T. 2004b. Fish can encode order in their spatial map. *Proceedings. Biological sciences* 271(1553):2131–4.
- Buznikov, G. A., W. H. Lambert, y J. M. Lauder. 2001. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis.
- Cañon Jones, H. A., C. Noble, B. Damsgård, y G. P. Pearce. 2016. Evaluating the Effects of a Short-Term Feed Restriction Period on the Behavior and Welfare of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, parr Using Social Network Analysis and Fin

- Damage. Journal of the World Aquaculture Society.
- Carvalho, T. B., F. Z. Mendonça, R. S. Costa-Ferreira, y E. Gonçalves-de-Freitas. 2013. The effect of increased light intensity on the aggressive behavior of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Zoologia (Curitiba)* 30(2):125–129.
- Cavallari, N., E. Frigato, D. Vallone, N. Fröhlich, J. F. Lopez-Olmeda, A. Foà, R. Berti, F. J. Sánchez-Vázquez, C. Bertolucci, y N. S. Foulkes. 2011. A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biology* 9(9).
- Charnay, Y., y L. Léger. 2010. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues in clinical neuroscience* 12(4):471–87.
- Chauhan, T., y K. Rajiv. 2010. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1:281–291.
- Chomczynski, P., y N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156–159.
- Christie, M. R., M. L. Marine, R. A. French, y M. S. Blouin. 2012. Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. *PNAS* 109(1):238–242.
- Coccaro, E. F., J. R. Fanning, K. L. Phan, y R. Lee. 2015. Serotonin and impulsive aggression. *CNS Spectrums* 20(03):295–302.
- Coghill, L. M., C. Darrin Hulsey, J. Chaves-Campos, F. J. García de Leon, y S. G. Johnson. 2014. Next generation phylogeography of cave and surface *Astyanax mexicanus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79:368–374. Elsevier Inc.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, y E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.
- Connolly, K., y T. Trebic. 2010. Optimization of a backyard aquaponic food production system. Página B. Raghavan, editor *Bioresource Engineering*. McGill University, Quebec.
- Crick, F. 1970. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227:561–563.
- Damsgård, B., y F. Huntingford. 2012. Fighting and Aggression. Páginas 248–285

- en F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. *Aquaculture and Behavior*. Wiley-Blackwell.
- Dayer, A. 2014. Serotonin-related pathways and developmental plasticity: Relevance for psychiatric disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 16(1):29–41.
- Delcourt, J., y P. Poncin. 2012. Shoals and schools: Back to the heuristic definitions and quantitative references. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22(3):595–619.
- Duboué, E. R., y R. L. Borowsky. 2012. Altered rest-activity patterns evolve via circadian independent mechanisms in cave adapted balitorid loaches. *PLoS ONE* 7(2).
- Duboué, E. R., R. L. Borowsky, y A. C. Keene. 2012. β -adrenergic signaling regulates evolutionarily derived sleep loss in the mexican cavefish. *Brain, Behavior and Evolution* 80(4):233–243.
- Duboué, E. R., y A. C. Keene. 2016. Investigating the Evolution of Sleep in the Mexican Cavefish. Páginas 291–308 en A. C. Keene, M. Yoshizawa, y S. E. McGaugh, editores. *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Academic Press.
- Duboué, E. R., A. C. Keene, y R. L. Borowsky. 2011. Evolutionary Convergence on Sleep Loss in Cavefish Population. *Current Biology* 21:671–676.
- Dunham, R. A. 2011. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology and Genetics: Genetic Approaches* 2 ed. CABI Pub., UK.
- E. Barnes, M. 2011. Competitor Density and Size Effects on Aggression and Feeding in Cutthroat Trout: Implications for Aquaculture. *The Open Fish Science Journal* 4:62–66.
- Elipot, Y., H. Hinaux, J. Callebert, J.-M. Launay, M. Blin, y S. Rétaux. 2014a. A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome. *Nature communications* 5:3647.
- Elipot, Y., H. Hinaux, J. Callebert, y S. Rétaux. 2013. Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network. *Current Biology* 23(1):1–10.
- Elipot, Y., L. Legendre, S. Père, F. Sohm, y S. Rétaux. 2014b. *Astyanax*

- Transgenesis and Husbandry: How Cavefish Enters the Laboratory. *Zebrafish* 11(4):291–299.
- Ellen, E. D., T. B. Rodenburg, G. A. A. Albers, J. E. Bolhuis, I. Camerlink, N. Duijvesteijn, E. F. Knol, W. M. Muir, K. Peeters, I. Reimert, E. Sell-Kubiak, J. A. M. Van Arendonk, J. Visscher, y P. Bijma. 2014. The prospects of selection for social genetic effects to improve welfare and productivity in livestock. *Frontiers in Genetics* 5.
- Ellingsen, K., K. Grimsrud, H. M. Nielse, C. Mejdell, I. Olesen, P. Honkanen, S. Navrud, C. Gamborg, y P. Sandøe. 2015. Who cares about fish welfare?: a Norwegian study. *British Food Journal* 117(1):257–273.
- Elliott, W. R. 2016. Cave Biodiversity and Ecology of the Sierra de El Abra Region. Páginas 59–76 en A. C. Keene, M. Yoshizawa, y S. E. McGaugh, editores. *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Academic Press.
- Espinasa, L., N. Bonaroti, J. Wong, K. Pottin, E. Queinnec, y S. Rétaux. 2017. Contrasting feeding habits of post-larval and adult *Astyanax* cavefish. *Subterranean Biology* 21:1–17.
- Espinasa, L., Y. Yamamoto, y W. R. Jeffery. 2005. Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behavioural Processes* 70(2):144–148.
- FAO. 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Fernández, J., M. A. Toro, A. K. Sonesson, y B. Villanueva. 2014. Optimizing the creation of base populations for aquaculture breeding programs using phenotypic and genomic data and its consequences on genetic progress. *Frontiers in Genetics* 5:414.
- Filby, A. L., G. C. Paull, T. F. Hickmore, y C. R. Tyler. 2010. Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics* 11(1):498.
- Fleming, I. A., y F. Huntingford. 2012. Reproductive Behaviour. Páginas 286–321 en F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. *Aquaculture and Behavior*. Wiley-Blackwell.

- Fricke, D. 1987. Reaction to Alarm Substance in Cave Populations of *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Ethology* 76(4):305–308.
- Fuentes-Silva, C., G. M. Soto-Zarazúa, I. Torres-Pacheco, R. G. Guevara-González, J. F. García-Trejo, A. Flores-Rangel, J. Caballero-Pérez, y A. Cruz-Hernández. 2015. Influence of Extended Photoperiod on All Male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Production, Differential Gene Expression and Growth Rate. *International Journal of Agriculture & Biology* 17:785–790.
- Galfalvy, H., Y. Huang, M. A. Oquendo, D. Currier, y J. J. Mann. 2009. Increased risk of suicide attempt in mood disorders and TPH1 genotype. *Journal of Affective Disorders* 115(3):331–338.
- Gallo, N. D., y W. R. Jeffery. 2012. Evolution of Space Dependent Growth in the Teleost *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE* 7(8):1–12.
- García de Leaniz, C., I. A. Fleming, S. Einum, E. Verspoor, W. C. Jordan, S. Consuegra, N. Aubin-Horth, D. Lajus, B. H. Letcher, A. F. Youngson, J. H. Webb, L. A. Vollestad, B. Villanueva, A. Ferguson, T. P. Quinn, y S. Biol Rev Camb Philos. 2007. A critical review of adaptive genetic variation in Atlantic salmon: implications for conservation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 82:173–211.
- García Trejo, J. F., G. A. Peña-Herrejon, G. M. Soto Zarazua, A. Mercado Luna, O. Alatorre Jacome, y E. Rico García. 2016. Effect of stocking density on growth performance and oxygen consumption of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under greenhouse conditions. *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(1):177–183.
- Gheyas, A. A., C. S. Haley, D. R. Guy, A. Hamilton, A. E. Tinch, J. C. Mota-Velasco, y J. A. Woolliams. 2010. Effect of a Major QTL Affecting IPN Resistance on Production Traits in Atlantic Salmon. *Animal Genetics* 41(6):666–668.
- Gjedrem, T., y N. Robinson. 2014. Advances by Selective Breeding for Aquatic Species: A Review. *Agricultural Sciences* 5:1152–1158.
- Gjedrem, T., N. Robinson, y M. Rye. 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture* 350–353:117–129.
- Gjedrem, T., y J. Thodesen. 2005. Selection. Páginas 89–111 en T. Gjedrem, editor. *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Springer Netherlands.

- Goddard, M. E., y B. J. Hayes. 2009. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature reviews. Genetics* 10(6):381–391. Nature Publishing Group.
- Gregson, J. N. S., y T. Burt de Perera. 2007. Shoaling in eyed and blind morphs of the characin *Astyanax fasciatus* under light and dark conditions. *Journal of Fish Biology* 70(5):1615–1619.
- Grimsrud, K. M., H. M. Nielsen, S. Navrud, y I. Olesen. 2013. Households' willingness-to-pay for improved fish welfare in breeding programs for farmed Atlantic salmon. *Aquaculture* 372–375:19–27. Elsevier B.V.
- Gross, J. B. 2012. The complex origin of *Astyanax* cavefish. *BMC Evolutionary Biology* 12(1):105. BioMed Central.
- Guo, S. 2009. Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function. *Expert Opinion on Drug Discovery* 4(7):715–726.
- Gutierrez-Wing, M. T., y R. F. Malone. 2006. Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering* 34:163–171.
- Hannon, J., y D. Hoyer. 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research* 195(1):198–213.
- Harrington, M. 2012. Refining zebrafish housing for more reliable results. *Lab. Anim. (NY)* 41(6):139.
- Hashimoto, H., T. Hayashi, K. Hamasaki, I. Kai, H. Hokazono, A. Nakamura, T. Iwasaki, K. Teruya, K. Hamada, y K. Mushiake. 2014. Aggressive Behavior and Cannibalism among Larval and Juvenile Size-classes in Mass-cultured Greater Amberjack *Seriola dumerili*. *Aquaculture Science* 62(3):259–271.
- He, Y.-H., L. Li, X.-F. Liang, S. He, L. Zhao, y Y.-P. Zhang. 2018. Inhibitory neurotransmitter serotonin and excitatory neurotransmitter dopamine both decrease food intake in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). *Fish Physiology and Biochemistry* 44(1):175–183.
- Heiming, R. S., A. Mning, F. Jansen, V. Kloke, K.-P. Lesch, y N. Sachser. 2013. To attack, or not to attack? The role of serotonin transporter genotype in the display of maternal aggression. *Behavioural Brain Research* 242:135–141.
- Herculano, A. M., y C. Maximino. 2014. Serotonergic modulation of zebrafish

- behavior: Towards a paradox. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 55:50–66.
- Hinaux, H., K. Pottin, H. Chalhoub, S. Père, Y. Elipot, L. Legendre, y S. Rétaux. 2011. A Developmental Staging Table for *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish. *Zebrafish* 8(4):155–165.
- Hinaux, H., S. Rétaux, y Y. Elipot. 2016. Social Behavior and Aggressiveness in *Astyanax*. Páginas 335–359 en A. C. Keene, M. Yoshizawa, y S. E. McGaugh, editores. *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*, 1a edición. Academic Press.
- Höglund, E., M. J. Bakke, Ø. Øverli, S. Winberg, y G. E. Nilsson. 2005. Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by l-tryptophan supplementation. *Aquaculture* 249(1–4):525–531.
- Holbrook, R. I., y T. Burt de Perera. 2013. Three-dimensional spatial cognition: Freely swimming fish accurately learn and remember metric information in a volume. *Animal Behaviour* 86(5):1077–1083.
- Hubbs, C. L., y W. T. Innes. 1936. The first known blind fish of the family Characidae: a new genus from Mexico. *Occasional Papers of the Museum of Zoology University of Michigan* (342):1–10.
- Huntingford, F. A., y C. Adams. 2005. Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behaviour* 142(9):1207–1221.
- Huntingford, F. A., y S. Kadri. 2014. Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 33(1):233–244.
- Huntingford, F., S. Coyle, y W. Hunter. 2012a. Avoiding Predators. Páginas 220–247 en F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. *Aquaculture and Behavior*. Wiley-Blackwell.
- Huntingford, F., W. Hunter, y V. Braithwaite. 2012b. Movement and Orientation. Páginas 87–120 en F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. *Aquaculture and Behavior*. Wiley-Blackwell.
- Huntingford, F., M. Jobling, y S. Kadri. 2012c. Conclusions: Aquaculture and Behaviour. Páginas 322–332 en F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. *Aquaculture and Behavior*. Wiley-Blackwell.

- Huntingford, F., S. Kadri, y M. Jobling. 2012d. Introduction: Aquaculture and Behaviour. Páginas 1–35 en F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. Aquaculture and Behavior. Wiley-Blackwell.
- Huppopp, K., y H. Wilkens. 2009. Bigger eggs in subterranean *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 29(4):280–288.
- Idkowiak-Baldys, J., A. Baldys, J. R. Raymond, y Y. A. Hannun. 2009. Sustained Receptor Stimulation Leads to Sequestration of Recycling Endosomes in a Classical Protein Kinase C- and Phospholipase D-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* 284(33):22322–22331.
- Jager, A., D. A. Maas, K. Fricke, R. B. de Vries, G. Poelmans, y J. C. Glennon. 2018. Aggressive behavior in transgenic animal models: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 91:198–217.
- Jeffery, W. R. 2008. Emerging model systems in evo-devo: cavefish and microevolution of development. *Evolution & Development* 10(3):265–272.
- Jobling, M., A. Alanärä, S. Kadri, y F. Huntingford. 2012a. Feeding Biology and Foraging. Páginas 121–149 en F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. Aquaculture and Behavior. Wiley-Blackwell.
- Jobling, M., A. Alanärä, C. Noble, J. Sánchez-Vázquez, S. Kadri, y F. Huntingford. 2012b. Appetite and Feed Intake. Páginas 183–219 en F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. Aquaculture and Behavior. Wiley-Blackwell.
- Keene, A. C., M. Yoshizawa, y S. E. McGaugh. 2016. Biology and Evolution of the Mexican Cavefish. *Biología y Evolución del Pez Cavernícola Mexicano*, 1a edición. Academic Press.
- Kloosterman, B., M. Oortwijn, J. UitdeWilligen, T. America, R. de Vos, R. G. Visser, y C. W. Bachem. 2010. From QTL to candidate gene: Genetical genomics of simple and complex traits in potato using a pooling strategy. *BMC Genomics* 11(1):158.
- Kowalko, J. E., N. Rohner, T. a Linden, S. B. Rompani, W. C. Warren, R. Borowsky, C. J. Tabin, W. R. Jeffery, y M. Yoshizawa. 2013a. Convergence in feeding posture occurs through different genetic loci in independently evolved cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(12):6037–6042.

- Sciences of the United States of America 110(42):16933–8.
- Kowalko, J. E., N. Rohner, S. B. Rompani, B. K. Peterson, T. a. Linden, M. Yoshizawa, E. H. Kay, J. Weber, H. E. Hoekstra, W. R. Jeffery, R. Borowsky, y C. J. Tabin. 2013b. Loss of Schooling Behavior in Cavefish through Sight-Dependent and Sight-Independent Mechanisms. *Current Biology* 23(19):1874–1883. Elsevier Ltd.
- Lai, C.-Q., J. Leips, W. Zou, J. F. Roberts, K. R. Wollenberg, L. D. Parnell, Z.-B. Zeng, J. M. Ordovas, y T. F. C. Mackay. 2007. Speed-mapping quantitative trait loci using microarrays. *Nature methods* 4(10):839–841.
- Larsen, P. F., E. E. Nielsen, A. Koed, D. S. Thomsen, P. A. Olsvik, y V. Loeschcke. 2008. Interpopulation differences in expression of candidate genes for salinity tolerance in winter migrating anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.). *BMC Genetics* 9(1):12.
- Lawrence, C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269:1–20.
- Lawrence, C., y T. Mason. 2012. Zebrafish housing systems: A review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR Journal* 53(2):179–191.
- Lillehammer, M., T. H. E. Meuwissen, y A. K. Sonesson. 2013. A low-marker density implementation of genomic selection in aquaculture using within-family genomic breeding values. *Genet. Sel. Evol.* 45:39.
- Lillesaar, C. 2011. The serotonergic system in fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 41(4):294–308.
- Lippi, G., y M. Plebani. 2013. Biomarker research and leading causes of death worldwide: A rather feeble relationship. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51(9):1691–1693.
- Liu, S., Y. Zhang, F. Sun, Y. Jiang, R. Wang, C. Li, J. Zhang, y Z. J. Liu. 2012. Functional Genomics Research in Aquaculture: Principles and General Approaches. *Functional Genomics in Aquaculture*:1–40.
- Lorenz, O. T., S. A. Riccobono, y P. Smith. 2016. Effects of salinity on the survival and aggression of the invasive Rio Grande cichlid (*Herichthys cyanoguttatus*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 49(1):1–8.

- Malmstrøm, M., M. Matschiner, O. K. Tørresen, K. S. Jakobsen, y S. Jentoft. 2017. Whole genome sequencing data and de novo draft assemblies for 66 teleost species. *Scientific Data* 4:160132. The Author(s).
- Manegold, C., G. F. Hoffmann, I. Degen, H. Ikonomidou, A. Knust, M. W. Laaß, M. Pritsch, E. Wilichowski, y F. Hörster. 2009. Aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, drug therapy and follow-up. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 32(3):371–380.
- Martins, C. I. M., L. Galhardo, C. Noble, B. Damsgård, M. T. Spedicato, W. Zupa, M. Beauchaud, E. Kulczykowska, J. C. Massabuau, T. Carter, S. R. Planellas, y T. Kristiansen. 2012. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 38:17–41.
- Martins de Almeida, R. M., P. F. Ferrari, S. Parmigiani, y K. A. Miczek. 2005. Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA. *European Journal of Pharmacology* 526(1–3):51–64.
- Matthes, S., V. Mosienko, S. Bashammakh, N. Alenina, y M. Bader. 2010. Tryptophan Hydroxylase as Novel Target for the Treatment of Depressive Disorders. *Pharmacology* 85(2):95–109.
- Miller, R. R., W. L. Minckley, S. M. Norris, y J. J. Schmitter Soto. 2009. Peces dulceacuícolas de México.
- Mohammad-Zadeh, I. F., L. Moses, y S. M. Gwaltney-Brant. 2008. Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31(3):187–199.
- Morgulis, A., G. Coulouris, Y. Raytselis, T. L. Madden, R. Agarwala, y A. A. Schäffer. 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24(16):1757–1764.
- Naji, A., F. Etezadi, R. S. Moharari, P. Pourfakhr, y M. R. Khajavi. 2017. The role of neurotransmitters in anesthesia. *Archives of Anesthesiology and Critical Care* 3(2):324–333. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Nakatani, Y., I. Sato-Suzuki, N. Tsujino, A. Nakasato, Y. Seki, M. Fumoto, y H. Arita. 2008. Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. *European Journal of Neuroscience* 27(9):2466–2472.
- Narvaes, R., y R. M. Martins de Almeida. 2014. Aggressive behavior and three neurotransmitters: dopamine, GABA, and serotonin—A review of the last 10

- years. *Psychology & Neuroscience* 7(4):601–607.
- Nichols, K., A. Felip-Edo, P. Wheeler, y G. Thorgaard. 2008. The Genetic Basis of Smoltification-related Traits in *Oncorhynchus mykiss*. *Genetics* 179(3):1559–1575.
- Niederkofler, V., T. E. Asher, B. W. Okaty, S. G. Beck, K. A. Miczek, S. M. Dymecki, V. Niederkofler, T. E. Asher, B. W. Okaty, B. D. Rood, A. Narayan, y L. S. Hwa. 2016. Identification of Serotonergic Neuronal Modules that Affect Aggressive Behavior Article Identification of Serotonergic Neuronal Modules that Affect Aggressive Behavior. *CellReports* 17(8):1934–1949. ElsevierCompany.
- Nordquist, N., y L. Oreland. 2010. Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders - a review. *Upsala Journal of Medical Sciences* 115(1):2–10.
- Norton, W. H. J., A. Folchert, y L. Bally-Cuif. 2008. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (*slc6a4a/b*) gene expression in the zebrafish brain. *The Journal of Comparative Neurology* 511(4):521–542.
- O’Connell, L. a., y H. a. Hofmann. 2012. Evolution of a Vertebrate Social Decision-Making Network. *Science* 336(6085):1154–1157.
- O’Malley, K. G., T. Sakamoto, R. G. Danzmann, y M. M. Ferguson. 2003. Quantitative Trait Loci for Spawning Date and Body Weight in Rainbow Trout: Testing for Conserved Effects Across Ancestrally Duplicated Chromosomes. *J. Heredity* 94(4):273–284.
- Odegård, J., y T. H. E. Meuwissen. 2014. Identity-by-descent genomic selection using selective and sparse genotyping. *Genetics, selection, evolution : GSE* 46(1):3.
- Oers, K. Van, y D. L. Sinn. 2013. Quantitative and Molecular Genetics of Animal Personality. Páginas 148–200 *en* C. Carere y D. Maestriperi, editores. *Animal Personalities*. University of Chicago Press.
- Omote, H., y Y. Moriyama. 2013. Vesicular Neurotransmitter Transporters: An Approach for Studying Transporters With Purified Proteins. *Physiology* 28(1):39–50.
- Ornelas-García, C. P., y C. Pedraza-Lara. 2016. Phylogeny and Evolutionary History

- of *Astyanax mexicanus*. Páginas 77–90 en A. C. Keene, M. Yoshizawa, y S. E. McGaugh, editores. *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Academic Press.
- Ortega, V. A., D. A. Lovejoy, y N. J. Bernier. 2013. Appetite-suppressing effects and interactions of centrally administered corticotropin-releasing factor, urotensin I and serotonin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Neuroscience* 7.
- Patton, P., S. Windsor, y S. Coombs. 2010. Active wall following by Mexican blind cavefish (*Astyanax mexicanus*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 196(11):853–867.
- Peña-Herrejón, G. A., F. García-Trejo, G. M. Soto-Zarazúa, O. Alatorre-Jácome, y E. Rico-García. 2016. First trial of production of a native cichlid *Herichthys cyanoguttatus* comparison with the tilapia *Oreochromis niloticus* in aquaculture. *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(4):711–717.
- Pérez-Escudero, A., J. Vicente-Page, R. C. Hinz, S. Arganda, y G. G. de Polavieja. 2014. idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nature Methods* 11(7):743–748.
- Plath, M., M. Rohde, T. Schröder, A. Taebel-Hellwig, y I. Schlupp. 2006. Female mating preferences in blind cave tetras *Astyanax fasciatus* (Characidae, Teleostei). *Behaviour* 143:15–32.
- Portz, D. E., C. M. Woodley, y J. J. Cech. 2006. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 16(2):125–170.
- Prasad, P., S. Ogawa, y I. S. Parhar. 2015. Role of serotonin in fish reproduction. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- Protas, M., y W. R. Jeffery. 2012. Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1(6):823–845.
- Quinn, N. L., A. P. Gutierrez, B. F. Koop, y W. S. Davidson. 2012. Genomics and Genome Sequencing: Benefits for Finfish Aquaculture. Páginas 127–154 en Z. A. Muchlisin, editor. *Aquaculture*. InTech, Croatia.
- Rahman, M. S., y P. Thomas. 2009. Molecular cloning, characterization and expression of two tryptophan hydroxylase (TPH-1 and TPH-2) genes in the

- hypothalamus of Atlantic croaker: Down-regulation after chronic exposure to hypoxia. *Neuroscience* 158(2):751–765.
- Rambo, C. L., R. Mocelin, M. Marcon, D. Villanova, G. Koakoski, M. S. de Abreu, T. A. Oliveira, L. J. G. Barcellos, A. L. Piato, y C. D. Bonan. 2016. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. *Physiology & Behavior* 171:50–54. Elsevier Inc.
- Raubenheimer, D., S. Simpson, J. Sánchez-Vázquez, F. Huntingford, S. Kadri, y M. Jobling. 2012. Nutrition and Diet Choice. Páginas 150–182 *en* F. Huntingford, M. Jobling, y S. Kadri, editores. *Aquaculture and Behavior*. Wiley-Blackwell.
- Ren, G., S. Li, H. Zhong, y S. Lin. 2013. Zebrafish Tyrosine Hydroxylase 2 Gene Encodes Tryptophan Hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 288(31):22451–22459.
- Rétaux, S., y Y. Elipot. 2013. Feed or fight: A behavioral shift in blind cavefish. *Communicative & Integrative Biology* 6(2):e23166.
- Ribas, L., y F. Piferrer. 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture* 6(4):209–240.
- Roskov, Y., T. Kunze, L. Palinawan, T. Orrell, D. Nicolson, A. Culham, N. Bailly, P. Kirk, T. Bourgoïn, G. Baillargeon, F. Hernandez, y A. De Wever. 2013. Species 2000 & ITIS Catalogue of life: 11th March 2013. Species 2000, UK.
- Rueden, C. T., J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena, y K. W. Eliceiri. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18(1):529.
- Sadoglu, P. 1957. Mendelian inheritance in the hybrids between the Mexican blind cave fishes and their overground ancestor. *Verhandlungen Deutsche Zoologische Gesellschaft*:432–439.
- Saetre, P., P. Lundmark, A. Wang, T. Hansen, H. B. Rasmussen, S. Djurovic, I. Melle, O. A. Andreassen, T. Werge, I. Agartz, H. Hall, L. Terenius, y E. G. Jönsson. 2010. The tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) gene, schizophrenia susceptibility, and suicidal behavior: A multi-centre case-control study and meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153B(2):387–396.

- Salin, K., Y. Voituron, J. Mourin, y F. Hervant. 2010. Cave colonization without fasting capacities: An example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 156(4):451–457.
- Sallinen, V., M. Sundvik, I. Reenilä, N. Peitsaro, D. Khrustalyov, O. Anichtchik, G. Toleikyte, J. Kaslin, y P. Panula. 2009. Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. *Journal of Neurochemistry* 109(2):403–415.
- Schartl, M. 2014. Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. *Disease Models & Mechanisms* 7(2):181–192.
- Schneider, H., L. Fritzky, J. Williams, C. Heumann, M. Yochum, K. Pattar, G. Noppert, V. Mock, y E. Hawley. 2012. Cloning and expression of a zebrafish 5-HT_{2C} receptor gene. *Gene* 502(2):108–117.
- Silber, B. Y., y J. A. J. Schmitt. 2010. Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34(3):387–407.
- Singh, V. K., y A. Kumar. 2001. PCR Primer Design. *Molecular Biology Today* 2(2):27–32.
- Soares, D., y M. L. Niemiller. 2013. Sensory Adaptations of Fishes to Subterranean Environments. *BioScience* 63(4):274–283.
- Somorjai, I. M., R. G. Danzmann, y F. M. M. 2003. Distribution of Temperature Tolerance Quantitative Trait Loci in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) and Inferred Homologies in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetics* 165(3):1443–1456.
- Soto-Zarazúa, G., J. Fernando García-Trejo, M. Toledano-Ayala, y E. Rivas-Araiza. 2014. Aquatic Biosystems: Applications in Aquacultural Engineering as a Sustainable Technology. Páginas 277–287 *en* R. Guevara-Gonzalez y I. Torres-Pacheco, editores. *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*. Springer International Publishing.
- Steiner, J. A., A. M. D. Carneiro, y R. D. Blakely. 2008. Going with the Flow: Trafficking-Dependent and -Independent Regulation of Serotonin Transport. *Traffic* 9(9):1393–1402.

- Stock, K. F., y R. Reents. 2013. Genomic selection: Status in different species and challenges for breeding. *Reprod. Domest. Anim.* 48(s1):2–10.
- Strickler, A. G., y W. R. Jeffery. 2009. Differentially expressed genes identified by cross-species microarray in the blind cavefish *Astyanax*. *Integr. Zool.* 4(1):99–109.
- Strimbu, K., y J. A. Tavel. 2010. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5(6):463–466.
- Swallow, J. G., A. N. Bubak, y J. L. Grace. 2016. The role of monoamines in modulating behavior. *Current Zoology* 62(3):253–255.
- Tabor, H. K., N. J. Risch, y R. M. Myers. 2002. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics* 3(5):391–397.
- Takahashi, A., T. Shiroishi, y T. Koide. 2014. Genetic mapping of escalated aggression in wild-derived mouse strain MSM/Ms: association with serotonin-related genes. *Frontiers in Neuroscience* 8.
- Tan, D., P. Patton, y S. Coombs. 2011. Do blind cavefish have behavioral specializations for active flow-sensing? *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 197(7):743–754.
- Teles, M. C., y R. F. Oliveira. 2016. Quantifying Aggressive Behavior in Zebrafish. Páginas 293–305 *en* K. Kawakami, E. E. Patton, y M. Orger, editores. *Zebrafish: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY.
- Teletchea, F., y P. Fontaine. 2014. Levels of domestication in fish: Implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish and Fisheries* 15(2):181–195.
- Teraoka, H., C. Russell, J. Regan, A. Chandrasekhar, M. L. Concha, R. Yokoyama, K. Higashi, M. Take-uchi, W. Dong, T. Hiraga, N. Holder, y S. W. Wilson. 2004. Hedgehog and Fgf signaling pathways regulate the development of tphR-expressing serotonergic raphe neurons in zebrafish embryos. *Journal of Neurobiology* 60(3):275–288.
- Theódór, K., y P. Árnasson. 2014. *Breeding Design for Atlantic Cod*. Agricultural University of Iceland, Iceland.
- Theodoridi, A., A. Tsalafouta, y M. Pavlidis. 2017. Acute Exposure to Fluoxetine Alters Aggressive Behavior of Zebrafish and Expression of Genes Involved in

- Serotonergic System Regulation. *Frontiers in Neuroscience* 11.
- Timmons, M. B., J. M. Ebeling, y Northeastern Regional Aquaculture Center. 2010. *Recirculating Aquaculture*, 2a edición. Cayuga Aqua Ventures, United States.
- Ulloa, P. E., P. Iturra, R. Neira, y C. Araneda. 2011. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: Towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21(4):649–666.
- Ulloa, P. E., J. F. Medrano, y C. G. Feijoo. 2014. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Frontiers in Genetics* 5:313.
- Veroude, K., Y. Zhang-James, N. Fernández-Castillo, M. J. Bakker, B. Cormand, y S. V Faraone. 2016. Genetics of aggressive behavior: An overview. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 171(1):3–43.
- Villamizar, N., L. M. Vera, N. S. Foulkes, y F. J. Sánchez-Vázquez. 2014. Effect of Lighting Conditions on Zebrafish Growth and Development. *Zebrafish* 11(2):173–181.
- Visscher, P. M., W. G. Hill, y N. R. Wray. 2008. Heritability in the genomics era-- concepts and misconceptions. *Nat. Rev. Genet.* 9(4):255–256.
- Volkoff, H. 2016. Feeding Behavior, Starvation Response, and Endocrine Regulation of Feeding in Mexican Blind Cavefish (*Astyanax fasciatus mexicanus*). Páginas 269–290 *en* A. C. Keene, M. Yoshizawa, y S. E. McGaugh, editores. *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Academic Press.
- Wakchaure, R., S. Ganguly, P. K. Praveen, A. Kumar, S. Sharma, y T. Mahajan. 2015. Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology* 6(5):e127.
- Wang, Y., R. Takai, H. Yoshioka, y K. Shirabe. 2006. Characterization and Expression of Serotonin Transporter Genes in Zebrafish. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 208(3):267–274.
- Wen, L., W. Wei, W. Gu, P. Huang, X. Ren, Z. Zhang, Z. Zhu, S. Lin, y B. Zhang. 2008. Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Developmental Biology* 314(1):84–92.
- Wikie, M. P. 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *J. Exp. Zool.* 293:284–301.

- Winberg, S., y P.-O. Thörnqvist. 2016. Role of brain serotonin in modulating fish behavior. *Current Zoology* 62(3):317–323.
- Wurts, W. A. 2002. Alkalinity and hardness in production ponds. *World Aquac.* 33:16–17.
- Yamamoto, K., J. O. Ruuskanen, M. F. Wullimann, y P. Vernier. 2011. Differential expression of dopaminergic cell markers in the adult zebrafish forebrain. *The Journal of Comparative Neurology* 519(3):576–598.
- Yamamoto, Y., y W. R. Jeffery. 2000. Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* 289(5479):631–633.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, y T. L. Madden. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13(1):134.
- Yoshizawa, M. 2016. The Evolution of Sensory Adaptation in *Astyanax mexicanus*. Páginas 247–267 en A. C. Keene, M. Yoshizawa, y S. E. McGaugh, editores. *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Academic Press.
- Yoshizawa, M., Š. Gorički, D. Soares, y W. R. Jeffery. 2010. Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Current Biology* 20(18):1631–1636.
- Yoshizawa, M., W. R. Jeffery, S. M. van Netten, y M. J. McHenry. 2014. The sensitivity of lateral line receptors and their role in the behavior of Mexican blind cavefish (*Astyanax mexicanus*). *Journal of Experimental Biology* 217(6):886–895.
- Yoshizawa, M., B. G. Robinson, E. R. Duboué, P. Masek, J. B. Jaggard, K. E. O’Quin, R. L. Borowsky, W. R. Jeffery, y A. C. Keene. 2015. Distinct genetic architecture underlies the emergence of sleep loss and prey-seeking behavior in the Mexican cavefish. *BMC Biology* 13(1):15.
- Yue, G. H. 2014. Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture. *Fish and Fisheries* 15(3):376–396.
- Yuryev, A. 2007. PCR Primer Design. Página PCR Primer Design. Humana Press.
- Zhang, Y., Q. Ming, J. Yi, X. Wang, Q. Chai, y S. Yao. 2017. Gene-Gene-Environment Interactions of Serotonin Transporter, Monoamine Oxidase A and Childhood Maltreatment Predict Aggressive Behavior in Chinese Adolescents.

Frontiers in Behavioral Neuroscience 11.

Zhu, M., y S. Zhao. 2007. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int J Biol Sci* 3:420–427.