

**EVALUACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN DE *Ambystoma mexicanum* Y *Ambystoma velasci* MEDIANTE DOS FORMAS DE APLICACIÓN HORMONAL**

**[REPRODUCTION ASSESSMENT OF *Ambystoma mexicanum* AND *Ambystoma velasci* THROUGH TWO PROCEDURES OF HORMONAL APPLICATION]**

**Gabriela Vázquez-Silva<sup>1§</sup>, Fernando Carlos Arana-Magallón<sup>1</sup>, Ana Karen López-de la Rosa<sup>1</sup>, Germán Mendoza-Martínez<sup>1</sup>, José Antonio Martínez-García<sup>3</sup>, Pedro Abel Hernández-García<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Profesor Investigador, Laboratorio de Limnobiología y Acuicultura, Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calzada. Del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, Ciudad de México. <sup>2</sup>Profesor Investigador, Centro Universitario UAEM Amecameca. Carretera. Amecameca-Ayapango KM 2.5, 56900, Edo. México. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: (gavaz@correo.xoc.uam.mx).

**RESUMEN**

Los ajolotes *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma velasci* son anfibios endémicos de la Cuenca de México, actualmente se encuentran en riesgo debido a la disminución de sus poblaciones silvestres. Una alternativa para su conservación es la reproducción en cautiverio, siendo la inducción hormonal una de las estrategias más viables. El objetivo fue evaluar la respuesta reproductiva de *A. mexicanum* y *A. velasci* mediante la estimulación hormonal con gonadotropina coriónica humana (GCH) con dos formas de aplicación. Se seleccionaron nueve parejas de cada especie, distribuidos en tres tratamientos: un grupo control sin hormona y dos grupos estimulados con 250 UI de GCH, pero con aplicaciones asincrónicas y sincrónicas de la hormona. Sin embargo, la reproducción de *A. mexicanum* y *A. velasci* es posible con la estimulación hormonal asincrónica; siendo más marcada cuando se aplica por segunda vez en el macho y de forma sincrónica a la hembra, registrándose mayor porcentaje de viabilidad de huevos. Por lo que para mejorar el éxito reproductivo se sugiere realizar más estudios para conocer la cantidad exacta y estimular la reproducción en dichas especies.

**Palabras clave:** Ajolote, conservación, estimulación hormonal, *ex situ*.

**ABSTRACT**

The axolotls *Ambystoma mexicanum* and *Ambystoma velasci* are endemic amphibians of the Basin of Mexico, currently they are at risk due to the decrease in their wild populations. An alternative for its conservation is reproduction captivity, with hormonal induction being one of the most viable strategies. The objective was to evaluate the reproductive response of *A. mexicanum* and *A. velasci* through hormonal stimulation with Human Chorionic Gonadotropin (HCG) with two forms of application. Nine pairs of each species were selected, distributed in three treatments: a control group without hormone and two groups stimulated with 250 IU of HCG but with asynchronous and synchronous applications of the hormone. The application of the GCH in both species, as well as the weight and height did not show significant differences ( $P > 0.05$ ). However, the reproduction of *A. mexicanum* and *A. velasci* is possible with asynchronous hormonal stimulation; being more marked when it is applied for the second time in the male and synchronously to the female, registering a higher percentage of egg viability. Therefore, to improve reproductive success, more studies should be done to understand to know the exact amount and stimulate reproduction in these species.

**Index words:** Axolotl, conservation, hormonal stimulation, *ex situ*.

## INTRODUCCIÓN

Los anfibios caudados son un grupo de vertebrados con una gran diversidad, la Unión Mundial para la Conservación de la Naturaleza menciona que aproximadamente un tercio de los anfibios se encuentran en peligro de extinción, y alrededor de 120 especies han desaparecido (SEMARNAT, 2018). México se considera el quinto país con mayor riqueza de anfibios, específicamente el grupo de las salamandras de la familia Ambystomatidae presentan un grado de endemismo del 88.8%, a nivel nacional 164 especies están amenazadas lo cual resalta la importancia de este grupo (Parra-Olea *et al.*, 2014).

Los ajolotes *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma. velasci* son urodelos endémicos de México cuyas poblaciones se han visto reducidas en los últimos años debido a una serie de presiones antropogénicas entre las que se encuentran; el cambio de uso de suelo, fragmentación de su hábitat, introducción de especies invasoras, sobreexplotación, contaminación y enfermedades que afectan gravemente sus poblaciones (Ortiz-Ordoñez *et al.*, 2016; SEMARNAT, 2018 Vázquez *et al.*, 2017; Mendoza *et al.*; 2019; Vázquez *et al.*, 2019) situando *A. mexicanum* como especie en peligro de extinción y *A. velasci* como especie sujeta a protección especial en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Debido a esto se han buscado estrategias para la conservación de la diversidad de las especies endémicas que se encuentran en alguna categoría de riesgo o peligro de extinción como lo es su reproducción y crianza *ex situ* (Ananjeva *et al.*, 2015). La reproducción es una importante herramienta para la comprensión de su biología y tiene como propósito la conservación de las especies, pero actualmente el número de anfibios reproducidos y criados en cautiverio es mínimo (Wild, 2009; Ananjeva *et al.*, 2015, Jiménez *et al.*, 2017). El ciclo reproductivo incluye varios componentes como es la gametogénesis, fecundidad, duración del desarrollo embrionario, edad reproductiva, esfuerzo reproductivo, limitaciones ambientales y el cuidado parental (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009).

En los anfibios las señales externas del medio ambiente son las responsables de la producción hormonal a través del hipotálamo, la hipófisis y las gónadas (Norris, 2011), la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es producida en el hipotálamo y es la encargada de estimular la liberación de las gonadotropinas hipofisarias a través de la circulación sanguínea, estas gonadotropinas promueven el desarrollo de las gónadas, la formación de gametos, la producción de hormonas sexuales, y la estimulación del desove (Obringer *et al.*, 2000; Norris y López, 2010).

La inducción hormonal es una técnica utilizada para la reproducción de diferentes especies con dificultad de reproducción en cautiverio, ya sea con fines de comercio o de conservación (Kouba, *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2017). Se han utilizado sustancias inductoras en diferentes concentraciones y combinaciones como son; la hormona gonadotropina coriónica humana (GCH), la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), buscando activar el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada fuera de la época reproductiva y activar la conducta sexual y por consiguiente la espermatogénesis en machos y/o la ovulación en las hembras (Aguilar- Miguel *et al.*, 2009 Trujillo *et al.*, 2015).

Actualmente, los trabajos sobre la reproducción por medio de inducción hormonal en especies silvestres han sido recientes y escasos debido a su difícil acceso y desconocimiento biológico; en el caso de los anfibios, la mayoría de los estudios se han centrado en anuros como *Rana pipiens* y *Xenopus laevis*, mientras que especies del género *Ambystoma* han sido escasamente estudiadas en cuanto a su estimulación para la reproducción (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009). Por consiguiente, es necesario realizar estudios sobre la biología de reproducción *ex situ* de las especies *A. mexicanum* y *A. velasci* y complementada con un buen manejo, y nutrición se puedan realizar estrategias para su conservación (Casas-Andreu *et al.*, 2004). Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar la reproducción de *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma velasci* mediante la estimulación hormonal con gonadotropina coriónica humana con dos formas de aplicación asincrónica y sincrónica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de Limnobiología y Acuicultura de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, utilizando dos colonias de *Ambystoma mexicanum* y de *Ambystoma velasci* de dos años de edad. Considerando los caracteres sexuales de machos y hembras fueron seleccionadas 18 parejas de ajolotes, de las cuales nueve correspondieron a *A. mexicanum* (nueve machos con un Peso promedio=105g±10.64, Longitud Total=24cm±0.64, Longitud Hocico-Cloaca=12.45cm±0.31 y nueve hembras con Peso promedio=105.9g±10.34, Longitud Total=23.44cm±1.21 y Longitud Hocico-Cloaca=11.73cm±0.59) y nueve parejas de *A. velasci* (nueve machos con un Peso promedio=102.48g±21.53, Longitud Total=23.16cm ±1.60 y Longitud Hocico-Cloaca=12.59cm±0.82 y nueve hembras con Peso promedio=108.7g±21.32, Longitud Total= 24.47cm ±1.63 y Longitud Hocico-Cloaca=12.71cm±0.53). La alimentación de los reproductores se basó en una dieta basal de gusano de fango *Tubifex* spp a una tasa de alimentación del 10% de su peso. El ensayo consistió en tres tratamientos para cada especie, un grupo control a las cuales no se les suministró hormona para su reproducción (parejas C1, C2 y C3), un grupo estimulado con hormona la cual se aplicó de forma asincrónica (parejas A1, A1 y A3), es decir, la hormona se aplicó primero al macho y ocho días después a la hembra, y por último otro grupo donde se administró inicialmente la hormona al macho y transcurridos ocho días de forma sincrónica se suministró dicha hormona al macho y a la hembra (parejas B1, B2 y B3). En ambos tratamientos se aplicaron 250 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (HCG; (Choriomon®), administrada con base al peso de cada ejemplar de acuerdo al método propuesto por Armstrong y Gillespie (1989).

Antes de la estimulación hormonal cada pareja fue anestesiada con aceite de clavo (100 µL/L) para posteriormente inyectar la hormona vía intramuscular a hembras y machos. Al inicio y final del ensayo se registró la Longitud Total (LT), Longitud Hocico-Cloaca (LHC) y peso de cada organismo. Pasado el efecto de la anestesia cada pareja fue colocada en diferentes unidades experimentales con agua libre de cloro y constante aireación. Una vez que los reproductores de ajolote fueron estimulados se introdujo en cada tina *Casuarina* spp como sustrato para la fijación del desove, todas las parejas fueron monitoreados diariamente para identificar la presencia del espermatóforo así como de algún desove, una vez registrada la presencia de desoves se contabilizaron los huevos y se revisó la viabilidad de éstos; cada cinco días se realizó un recambio parcial de agua en todas las tinas de reproducción, el periodo que se dejaron emparejados fue de ocho días a partir de la estimulación hormonal. Por último, los datos del peso, LT y LHC iniciales y finales se compararon en un Análisis de la Varianza con una Prueba de Tukey en el programa JMP para identificar diferencias significativas entre sexos de ambas especies ( $P<0.05$ ). Las variables reproductivas como presencia de espermatóforos, desoves, viabilidad de los huevos y porcentaje de eclosión fueron registradas en un cuadro.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que las parejas de la especie *A. mexicanum* del grupo control no mostraron alguna respuesta reproductiva como la presencia de espermatóforos o deposición de huevecillos; mientras que, en el tratamiento A con estimulación hormonal asincrónica se registró la presencia de espermatóforo y desoves, cabe mencionar que sólo el desove de la pareja A1 fue viable (Cuadro 1). En el tratamiento B con estimulación hormonal sincrónica de esta misma especie, la hembra de la pareja B3 desovo, pero no hubo liberación de espermatóforo por parte del macho.

En la especie *A. velasci* la pareja control C3 registró la presencia de un espermatóforo y un desove viable (Cuadro 1). Por otra parte, las hembras del tratamiento A (estimulación hormonal asincrónica) lograron desovar, pero debido a que los machos no liberaron los espermatóforos no hubo fecundación en los huevos, así mismo las parejas del tratamiento B (estimulación hormonal sincrónica) no tuvieron éxito en la reproducción.

**Cuadro 1.** Variables reproductivas de las parejas de ajolotes *Ambystoma mexicanum* y *Ambystoma velasci* estimuladas con hormona GCH.

Variables reproductivas	Control			Trat. A			Trat. B			Control			Trat. A			Trat. B		
				<i>A. mexicanum</i>									<i>A. velasci</i>					
	C1	C2	C3	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	A1	A2	A3	B1	B2	B3
Presencia de espermatóforo	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Presencia de desove	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Número de desoves	0	0	0	1	1	1	-	-	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
Número de huevos por desove	0	0	0	179	298	405	-	-	15	0	0	392	314	402	382	0	0	0
Período de incubación (días)	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-
% de viabilidad	-	-	-	9.5	-	-	-	-	-	-	-	64	-	-	-	-	-	-
% de eclosión	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	35	-	-	-	-	-	-

(-) Ausencia de la variable, (+) Presencia de la variable

En los cuadros 2 y 3 se muestran los valores promedio de Peso, Longitud total y hocico-cloaca inicial y final de cada tratamiento para cada especie, por lo que después del periodo de reproducción indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para el peso en machos y hembras, en cuanto al tamaño son muy similares las tallas al inicio y al final del ensayo, lo que concuerda con Aguilar-Miguel *et al.* (2009) donde tampoco encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre sexos en el tamaño inicial y final durante la reproducción de dos especies de *Ambystoma* sp.

La liberación de desoves sin fecundar por parte de las hembras estimuladas en ambas especies de ajolote y de una hembra del grupo control de *A. velasci*, puede ser atribuido a que las hembras al ser estimuladas por hormonas o por las condiciones adecuadas del medio ambiente se ven obligadas a desovar, incluso sin haber recibido estímulo por parte de los machos (Browne y Zipper, 2007), mientras que la respuesta a la estimulación hormonal con GCH fue positiva en las hembras de ambas especies. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Browne y Zipper (2007) quienes mencionan que en el proceso de maduración gonadal de las hembras hay una disminución en la secreción de estradiol y un aumento en la producción de testosterona y progesterona lo que da origen al desove. Por otra parte, se observó que todos los machos de *A. velasci* y los machos de la estimulación hormonal del tratamiento B de *A. mexicanum* aun cuando fueron inducidos la hormona no tuvo una respuesta en la espermatogénesis y el comportamiento reproductivo como lo es la liberación del espermatóforo, una posible explicación es que la hormona fue reducida en concentración y no logró estimular la liberación hipofisiaria de las hormonas gonadotropicas propias de la especie (Trudeau *et al.*, 2010; Norris y López, 2010), sino que actuó mediante la imitación de la hormona luteinizante pasando por alto el eje hipotálamo-hipófisis (Whitaker, 2001). Kouba y Vance (2009) hacen referencia que la aplicación de la gonadotropina coriónica humana suele tener baja efectividad para algunas especies al no estimular el apareamiento lo que pudo haber influido en los machos al aplicarse una dosis menor a la de otros autores.

**Cuadro 2.** Valores promedio de talla y peso inicial y final de las parejas de ajolotes *Ambystoma mexicanum* del ensayo de estimulación hormonal.

	Tratamiento <i>A. mexicanum</i>				
Variables	Control	Tratamiento A	Tratamiento B	EEM	<i>P</i>
Inicial machos					
<i>N</i>	3	3	3		
Peso(g)	106.66 ±4.61	115.9± 4.15	92.83±2.59	2.321	0.0001
LT (cm)	23.83 ±0.11	24± 0.43	24.16±1.12	0.414	0.854
LHC (cm)	12.7 ± 2.17E-15	12.46 ± 0.41	12.2±0.15	0.150	0.140
Inicial hembras					
<i>n</i>	3	3	3		
Peso(g)	98 ±6.92	108.66± 15.04	111.03±2.95	5.609	0.290
LT (cm)	22.46 ± 0.11	24.6± 1.05	23.26± 1.15	0.523	0.071
LHC (cm)	11.4 ± 0	11.73 ± 0.80	12.06± 0.66	0.349	0.451
Final machos					
<i>n</i>	3	3	3		
Peso (g)	107.33 ±2.30	116.36± 3	93.33±4.12	2.099	0.0007
LT (cm)	23.9 ± 0.1	24.1± 0.43	24.4± 1.06	0.390	0.677
LHC (cm)	12.56 ± 0.05	12.43 ± 0.37	12.2± 0.09	0.131	0.218
Final hembras					
<i>n</i>	3	3	3		
Peso (g)	99 ±4.35	108.86± 14.40	111±2.64	5.093	0.281
LT (cm)	22.56 ± 0.05	24.66± 0.85	23.33± 1.10	0.465	0.048
LHC (cm)	11.4 ± 0.17	11.6 ± 0.72	12.06± 0.50	0.299	0.350

*n*= Número de ajolotes por tratamiento LT= Longitud Total, LHC= Longitud hocico cloaca.

**Cuadro 3.** Valores promedio de talla y peso inicial y final de las parejas de ajolotes *Ambystoma velasci* del ensayo de estimulación hormonal.

	Tratamiento <i>A. velasci</i>				
Variables	Control	Tratamiento A	Tratamiento B	EEM	<i>P</i>
Inicial machos					
<i>n</i>	3	3	3		
Peso(g)	125±4.58	91.8± 19.51	90.63±17.61	8.896	0.050
LT (cm)	24.33 ±0.28	22.56± 1.88	22.56±1.88	0.892	0.339
LHC (cm)	12.7± 0.23	12.5 ± 1.12	12.5±1.12	0.536	0.922
Inicial hembras					
<i>n</i>	3	3	3		
Peso(g)	128.1 ±29.88	100.43± 4.65	97.56±7.15	10.358	0.149
LT (cm)	25.9± 0.34	23.76± 1.72	23.76± 1.72	0.820	0.186

LHC (cm)	13.33 ± 0.28	12.4 ± 0.3	12.4 ± 0.3	0.171	0.012
Final machos					
<i>n</i>	3	3	3		
Peso (g)	124 ± 5.19	89.66 ± 17.03	90.03 ± 15.65	7.904	0.034
LT (cm)	24.33 ± 0.28	22.56 ± 1.88	22.56 ± 1.88	0.892	0.338
LHC (cm)	12.7 ± 0.3	12.53 ± 1.07	12.56 ± 1.27	0.564	0.976
Final hembras					
<i>n</i>	3	3	3		
Peso (g)	128 ± 29.54	96.03 ± 6.51	96.33 ± 6.02	10.283	0.113
LT (cm)	25.9 ± 0.05	23.76 ± 1.72	23.76 ± 1.72	0.819	0.185
LHC (cm)	13.26 ± 0.15	12.43 ± 0.20	12.36 ± 0.15	0.101	0.001

*n*= Número de ajolotes por tratamiento LT= Longitud Total, LHC= Longitud hocico cloaca.

Sin embargo, estudios como el de Armstrong y Gillespie (1989), Aguilar-Miguel *et al.* (2009) y Jiménez *et al.* (2017) muestran resultados favorables al reproducir diferentes especies *Ambystoma* sp con dosis altas de gonadotropina coriónica humana de 350, 500 UI, y 750, 900 UI aplicada a hembras y machos, con una fecundidad del 26 al 90%, teniendo de 400 a 500 huevos aproximadamente; sin embargo, el trabajo realizado por Yáñez *et al.* (2017) registró que la inducción hormonal en *A. velasci* incremento la aceleración en la deposición de espermatóforos por parte de los machos así como el comportamiento reproductivo de las hembras aplicando una dosis de 250 UI de hormona con inducción simple teniendo un promedio de 1011 huevos de los cuales el 81.8% resultaron viables, mientras que en el tratamiento con inducción doble se registró presencia desoves con un promedio de 278 huevos con una viabilidad del 91.72%, el resultado obtenido es mayor al de este trabajo aun que se aplicó la misma cantidad de hormona pero a pesar de ello esto demuestra que la inducción hormonal es una opción viable para conservación de la especie en cautiverio por lo que se recomienda seguir el desarrollo embrionario de los huevos obtenidos por este método.

Por otra parte Bonilla *et al.* (2018) reportaron que usando una dosis más alta de GCH (5000 UI) suministrada a parejas de *A. mexicanum* con aplicación asincrónica es posible estimular el comportamiento reproductivo y obtener desoves viables, pero hay que tener en cuenta que la respuesta ante la cantidad y el intervalo de la inducción varían drásticamente entre cada especie (Browne y Zipper, 2007), por lo que se requieren más pruebas con varias concentraciones para optimizar su uso en otras especies como las de este trabajo ya que aún que se usó una dosis de 250 UI si se logró la reproducción en las parejas inducidas de manera asincrónica de *A. mexicanum* y en hembras de *A. velasci*, observándose desoves al día siguiente de la estimulación y que lograron ser viables.

Rangel-Ramírez (2017) menciona que el uso de hormonas liberadoras de gonadotropinas en la reproducción de anfibios han demostrado que son la alternativa más viable para la conservación de las especies en cautiverio ya que facilitan la obtención de desoves de buena calidad, pero también depende de la hormona que se esté utilizando, ya que además del uso de la gonadotropina coriónica humana en anfibios, otra hormona que ha mostrado resultados favorables en la reproducción, es la aplicación de la hormona acetato de buserelina para la reproducción inducida en ranas con una alta tasa de fecundación del 91.42%. Por lo que es importante estandarizar las técnicas de inducción hormonal para obtener los mejores resultados, en este caso para los géneros de *Ambystoma* sp. ya que por sus características anatómicas, fisiológicas, reproductivas y ecológicas son modelos viables para su estudio.

## CONCLUSIÓN

La estimulación hormonal con 250 UI de GCH con aplicación asincrónica en *A. mexicanum* fue positiva para ambos sexos lográndose la reproducción, mientras que en la aplicación sincrónica de esta concentración se observó que es insuficiente para estimular el comportamiento reproductivo en machos de *A. mexicanum* y *A. velasci* así como la inducción asincrónica en esta última, a diferencia de las hembras en donde ambas formas de aplicación y dosis si hubo una respuesta en la ovulación, por lo que para mejorar el éxito reproductivo se tendrán que realizar más estudios para conocer la cantidad exacta para estimular la reproducción en dichas especies sin alterar la fisiología de las gónadas, además se debe considerar la conducta reproductiva de estas especies para así poder realizar estrategias para su conservación *ex situ*.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar-Miguel, M., G. Legorreta y G. Casas-Andreu. 2009. Reproducción *ex situ* en *Ambystoma granulatum* y *Ambystoma lermaense* (Amphibia: Ambystomatidae). *Acta zoológica mexicana*, 25(3): 443-454.
- Ananjeva, N.B., V.K. Uteshev, N.L. Orlov & E.N. Gakhova. 2015. Strategies for conservation of endangered amphibian and reptile species. *Biology Bulletin*, 42(5): 432-439.
- Armstrong, J.B & L.L. Gillespie. 1989. Induced spawnings and artificial insemination in the axolotl. *Axolotl Newsletter* 10:1-4.
- Bonilla, G.J., B. Kuri Z., D.K. Martínez O., F.C.M. Arana y G.S. Vázquez. 2018. Reproducción del *Ambystoma mexicanum* con el uso de la Hormona Gonadotropina Coriónica Humana. In: Congreso Encuentro Académico del día del Biólogo, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Ciudad de México, México.
- Browne, R. K & K. Zippel. 2007. Reproduction and larval rearing of amphibians. *ILAR journal*, 48(3): 214-234.
- Casas-Andreu, G., R. Cruz-Aviña y X. Aguilar-Miguel. 2004. Un regalo poco conocido de México al mundo: el Axolote o Axólotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia Ergo Sum* 1(1): 304-308.
- Jiménez, O., J. Cruz, E. Ramírez, G. Figueroa y G. Casas. 2017. Conservación *ex-situ* de poblaciones en riesgo de ajolotes (*Ambystoma* spp.) del Estado de Puebla, México. *Revista Latinoamericana del Ambiente y las Ciencias*, 8(18): 1-10.
- Kouba, A. J., C.K. Vance & E.L. Willis. 2009. Artificial fertilization for amphibian conservation: current knowledge and future considerations. *Theriogenology*, 71(1): 214-227.
- Mendoza, M.G.D., G. Vázquez S., J.A. Martínez G., P.A. Hernández G., F.C. Arana M., A.K. López De la R. y J. Munguía V. 2019. Enriquecimiento de la dieta basal del Ajolote *Ambystoma velasci* con un filogénico polihierbal para su crecimiento y sobrevivencia. In XIX Congreso Bienal AMENA Forjando nuevos Horizontes en Nutrición Animal. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. México. 78 p
- Norris, D.O. 2011. Hormones and reproductive patterns in urodele and gymnophionid amphibians. In *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, Vol. 1 Academic Press, Elsevier. 187-202 p.
- Norris, D. O & K. H. López. 2010. Hormones and reproduction of vertebrates. (Vol. 1). Academic Press. 171-186 p.
- Obringer, A.R., J. K. O'Brien, R.L. Saunders, K. Yamamoto, S. Kikuyama & T.L. Roth. 2000. Characterization of the spermiation response, luteinizing hormone release and sperm quality in the American toad (*Bufo americanus*) and the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproduction, fertility and development*, 12(2): 51-58.

- Ortiz-Ordoñez, E., E. López-López, J.E. Sedeño-Díaz, E. Uría, I.A. Morales, M.E. Pérez and M. Shibayama. 2016. Liver histological changes and lipid peroxidation in the amphibian *Ambystoma mexicanum* induced by sediment elutriates from the Lake Xochimilco. *Journal of Environmental Sciences*, 46: 156-164.
- Parra-Olea, G., O. Flores-Villela, y C. Mendoza-Almeralla. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85:460-466.
- Rangel-Ramírez, M.T. 2017. Protocolo para reproducción, incubación y crecimiento de Rana Toro Americana (*Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802), en condiciones controladas en México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas Área de Ecología y Conservación, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacan, México. 140 p
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2018. Día Mundial de los Anfibios. Blog de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Ciudad de México, abril de 2018. (Consultado: 08/03/2021). Disponible en: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/dia-mundial-de-los-anfibios>
- Trujillo, J., O. Carballo y Y. Sais 2015: Reproducción asistida mediante el uso de hormonas en la rana cubana *Osteopilus septentrionalis*. (Anura: Hylidae). *Revista de toxicología en línea RETEL*. La Habana. Cuba, 22 p.
- Trudeau, V, G. Somoza, G. Natale, B. Pauli, J. Wignall, P. Jackman, K. Doe y F. Schueler. 2010. Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. *Reproductive Biology and Endocrinologym*, 8(1): 36.
- Vázquez, S.G., F.M. Arana, S.O. Pacheco, A.S. Martínez y K. López De la R. 2017. Uso de sustratos sintéticos y naturales como refugio de *Ambystoma mexicanum* en el crecimiento y supervivencia. *In: XII Congreso Nacional de Zoología*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Vázquez, S. G., F.C.M. Arana, A.K. López de la R., G.D.M. Mendoza, J.A.G. Martínez y P.A.G. Hernández. 2019. Efecto del enriquecimiento de la dieta del ajolote *Ambystoma velasci* con colina herbal. *In: XVI Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia*. León, Guanajuato, México.
- Whitaker, B. 2001. Reproduction. *En: Amphibian medicine and captive husbandry*. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida, 285-307 p.
- Wildt, D. 2009. Rescuing endangered animals with assisted reproductive technology. *ART and animals. Sexuality, reproduction y menopause (SRM) Journal*. 7 (2): 1.
- Yáñez, A. A.T., G.S. Vázquez, F.C.M. Arana, G.M. Mediana. 2017. Reproducción *ex situ* del ajolote *Ambystoma velasci*. *In: 13° Foro Estatal y 5° Foro Regional de Investigación y Experiencias Educativas y Productivas*. CBTA 190, Ocuilco, Morelos, México.