

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



IDENTIFICACION DEL SEXO Y EVALUACION DE LA
INDUCCION HORMONAL EN EL PEJELAGARTO
(*Atractosteus tropicus*)

T E S I S

QUE PRESENTA

LIC. EN BIOL. ULISES HERNANDEZ VIDAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
RECURSOS ALIMENTICIOS Y PRODUCCION ACUICOLA**

MONTERREY, N. L.

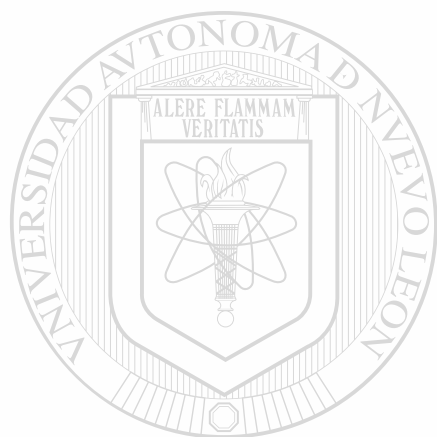
SEPTIEMBRE, 2002

TM
SH167
.P4
H4
2002
c.1

LIIC. EN BIOL. UJISER. HERMAN ANDERZ VIDAL. U. H. V.



1080124344



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

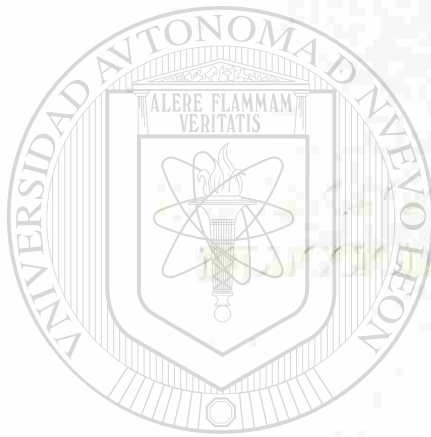


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
QUE PRESENTA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
LIC. EN BIOL. ULISES HERNÁNDEZ VIDAL

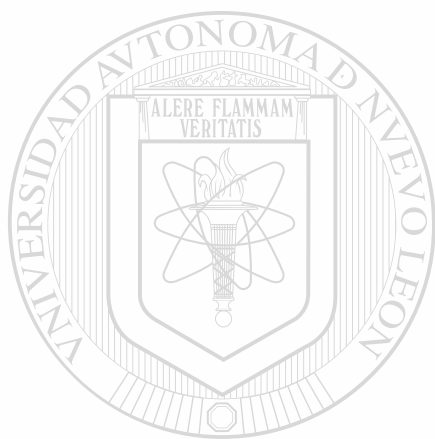
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
RECURSOS ALIMENTICIOS Y PRODUCCIÓN DE BIENES

México, D.F., N. L.

SEPTIEMBRE



TM
SH167
• P4
H4
200



UANL

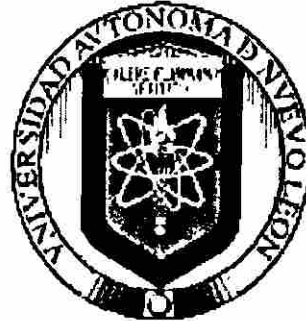
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Identificación del Sexo y Evaluación de la Inducción Hormonal
en el Pejelagarto (*Atractosteus tropicus*)



UANL

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

QUE PRESENTA

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
LIC. EN BIOL. ULISES HERNANDEZ VIDAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS
ALIMENTICIOS Y PRODUCCIÓN ACUÍCOLA

MONTERREY, N. L.

SEPTIEMBRE DEL 2002

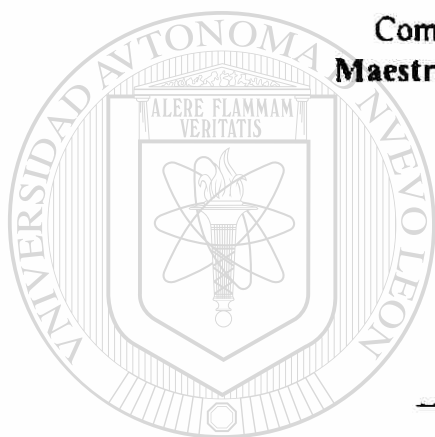
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**Identificación del Sexo y Evaluación de la Inducción Hormonal
en el Pejelagarto (*Atractosteus tropicus*)**

Tesis que presenta

LIC. EN BIOL. ULISES HERNANDEZ VIDAL

Como requisito parcial para obtener el grado de
**Maestro en Ciencias con Especialidad en Recursos
Alimenticios y Producción Acuícola**



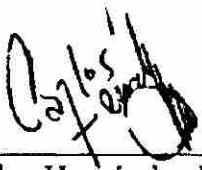
COMITÉ



Dr. Roberto E. Menchoza Alfaro
Director de Tesis



Dr. Carlos J. Aguilera González
Secretario



Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal

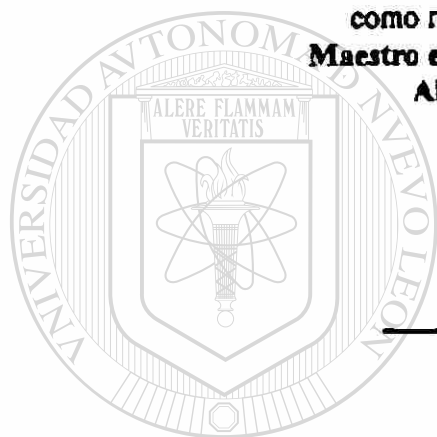
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**Identificación del Sexo y Evaluación de la Inducción Hormonal
en el Pejelagarto (*Atractosteus tropicus*):**

Tesis que presenta

LIC. EN BIOL. ULISES HERNANDEZ VIDAL

como requisito parcial para obtener el grado de
**Maestro en Ciencias con Especialidad en Recursos
Alimenticios y Producción Acuícola**



COMITÉ



Dr. Roberto E. Mendoza Alfaro
Director de Tesis



Dr. Carlos J. Aguilera González
Secretario



M. C. Gabriel Márquez Couturier
Vocal (Asesor Externo)



Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal

Vocal

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	8
3. ANTECEDENTES	
3.1. Rol de los Factores Ambientales en la Reproducción	9
3.2. Control Hormonal de la Reproducción	9
3.2.1. Función de la Hipófisis (glándula pituitaria)	9
3.2.2. Estructura y Función de las Gónadas	10
Testículos	11
Ovarios	11
Esteroides de Origen Gonadal	12
3.2.3. Gametogénesis	13
Espermatogénesis	13
Ovogénesis	13
3.3. Técnicas para la Identificación del Sexo y Evaluación de la Madurez en Peces	14
3.4. Agentes Inductores de la Maduración y Desove Utilizados en Acuicultura	16
3.5. Biología y Cultivo del Pejelagarto <i>Atractosteus tropicus</i>	18
3.5.1. Biología General y Aspectos Ecológicos	18
3.5.2. Biología de la Reproducción	20
3.5.3. Inducción al Desove en <i>A. tropicus</i>	21
4. MATERIAL Y METODOS.	
4.1. Captura y Aclimatación de Organismos	22
4.2. Identificación del Sexo de Ejemplares de <i>A. tropicus</i>	22
4.2.1. Purificación de la Vitelogenina Plasmática	22
4.2.2. Obtención de Anticuerpos Policlonales	25
4.2.3. Pruebas Cruzadas	26
4.2.4. Cuantificación de la Vitelogenina Plasmática	27
4.3. Inducción al Desove de <i>A. tropicus</i> .	28
4.3.1. Experimento 1. Evaluación del 17 β estradiol y el análogo superactivo des-Gly ¹⁰ - (D- Ala ⁶) LHRH ethylamide para inducir el desove en ejemplares de pejelagarto.	28
4.3.2. Experimento 2. Inducción al Desove de Pejelagarto mediante la inyección de los Análogos Superactivos des-Gly ¹⁰ - (D- Ala ⁶) LHRH ethylamide y D-Ala ⁶ -LHRHa.	29
4.3.3. Preparación de las Inyecciones	30
4.3.4. Acondicionamiento de los tanques para el desove	30
4.3.5. Evaluación de la Respuesta a la Inducción.	30
4.3.6. Cultivo de Larvas	31

4.4. Análisis Estadístico.	32
5. RESULTADOS.	
5.1. Reclutamiento de Organismos.	34
5.2. Identificación del Sexo	34
5.2.1. Purificación de la Vitelogenina	34
5.2.2. Selección y Antigenicidad de Anticuerpos	40
5.2.3. Pruebas Cruzadas y Examen Histológico	40
5.2.4. Cuantificación de la Vitelogenina Plasmática	44
Identificación de "Hembras"(Falsos-Positivos)	44
Identificación del Sexo	45
5.3. Inducción al Desove	47
5.3.1. Experimento 1. Evaluación del 17 β estradiol y el análogo superactivo des-Gly ¹⁰ - (D- Ala ⁶) LHRH ethylamide para inducir el desove en ejemplares de pejelagarto.	48
Respuesta a la Inducción	48
Calidad de Huevos y Larvas	48
Cultivo de Larvas	50
5.3.2. Experimento 2. Inducción al Desove de Pejelagarto mediante la inyección de los Análogos Superactivos des-Gly ¹⁰ - (D- Ala ⁶) LHRH ethylamide y D-Ala ⁶ -LHRHa.	52
Respuesta a la Inducción	52
Calidad de Huevos y Larvas	52
6. DISCUSION.	57
7. CONCLUSIONES	69
8. LITERATURA CITADA	70

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Universidad Autónoma de Nuevo León a través de la Subdirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Coordinación del Programa de Maestría RAPA por otorgarme una beca para realizar mis estudios de postgrado durante el periodo Agosto 1999-Julio 2001 (144124). A la Dirección General de Estudios de Postgrado de la UANL por otorgar un apoyo parcial y de igual forma al Sistema de Investigación Alfonso Reyes mediante el proyecto número 20000606065 del cual se obtuvo financiamiento para la realización de esta investigación.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el apoyo económico otorgado y las facilidades en la División Académica de Ciencias Biológicas durante la ejecución de este proyecto; en particular al Laboratorio de Acuicultura por brindar sus instalaciones y apoyar económicamente a través de los proyectos de colaboración e investigación con: PD/CRSP-OSU y FIRBCENTLA.

A mis asesores: Dr. Roberto Mendoza Alfaro, M. en C. Gabriel Márquez Couturier y Dr. Carlos Aguilera González, mi mas sincero agradecimiento ya que con su guía se pudieron alcanzar los objetivos propuestos en esta investigación y me permitieron tomar las rutas adecuadas durante el curso de la misma.

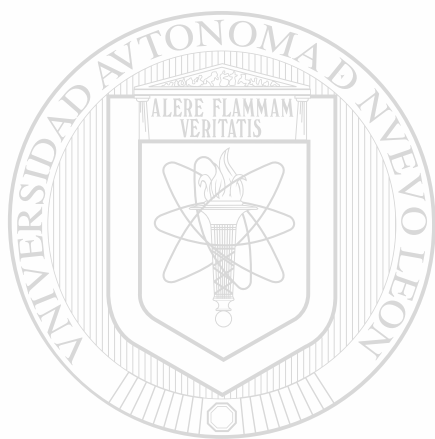
A mis compañeros y amigos de la generación Servando, Nancy, Verónica, Víctor, América y Luis quienes contribuyeron significativamente durante mi estancia en Monterrey apoyándome de manera incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecofisiología FCB/UANL quienes me apoyaron valiosamente y brindaron su amistad y compañerismo.

Al numeroso grupo del Laboratorio de Acuicultura DACB/UJAT quienes siempre han brindado un apoyo incondicional para desarrollar las diferentes labores de investigación

propuestas. En especial a aquellos que contribuyeron en las colectas en los pantanos y lagunas (a los cuales no quieren regresar); durante el montaje y ejecución de los experimentos, la larvicultura y todas las actividades implícitas. Sin su apoyo no hubiese podido superar estas fases. Quiero hacer especial mención de Alejandro, Lupita, Heleo, Alfredo, Laura, Deyanira, Sandra y los Colombianos. Un agradecimiento especial al Dr. Wilfrido Contreras por sus sugerencias metodológicas y en el manuscrito.

A las personas que nos permitieron facilidades de colecta de ejemplares para las pruebas preeliminarias y para constituir el grupo de reproductores en estudio.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue lograr la identificación del sexo y la inducción al desove de ejemplares de pejelagarto *Atractosteus tropicus* tomando como base el nivel de vitelogenina plasmática. A partir de VTG purificada obtenida de machos tratados con estradiol se obtuvieron anticuerpos que se emplearon para cuantificar los niveles de VTG de muestras de plasma de un lote de reproductores y de organismos silvestres capturados en diferentes regiones del estado de Tabasco. Los niveles de VTG obtenidos de las hembras se emplearon para distribuir grupos que fueron inducidos al desove con las hormonas D- Ala⁶-LHRHa; Des-Gly¹⁰-LHRHe; Estradiol y OvaprimTM. Las pruebas cruzadas realizadas con el plasma y el suero anti-VTG; así como los niveles de VTG permitieron identificar el sexo de ejemplares en cautiverio y silvestres. Con el protocolo cuantificación e inducción fue posible planificar desoves por un periodo de cuatro meses (antes restringido a dos semanas). Los tratamientos efectivos fueron aquellos en los que se emplearon los análogos y OvaprimTM produciendo tasas de fertilización y eclosión altas en los tratamientos evaluados. No se observaron problemas en la calidad de las larvas obtenidas en los diferentes desoves y la supervivencia más baja al término de la larvicultura fue mayor al 80% manteniendo una densidad de 20 ejemplares por litro. Los resultados de esta investigación indican que es posible identificar el sexo y planificar los desoves de pejelagarto. Igualmente la calidad de las crías obtenidas fuera del periodo normal de desove es adecuada y las larvas pueden obtenerse por un periodo mayor al obtenido en años anteriores en laboratorio y restringido a un par de semanas durante el mes de Agosto. Lo anterior es de gran importancia para el manejo de esta especie ya que es posible optimizar el uso de las instalaciones, lotes de reproductores y el personal para las labores de crianza intensiva de larvas.

ABSTRACT

The purpose of this study was to identify the sex and evaluate induced spawning of the tropical gar, *Atractosteus tropicus*, using plasmatic vitellogenin concentrations as reference. Purified vitellogenin (VTG) was obtained from estrogen treated males, which in turn was used to obtain polyclonal antibodies. These antibodies were used to measure the plasmatic concentrations of VTG in gars. Female VTG levels were used to separate groups of animals with similar levels and then induced with intraperitoneally injections of D-Ala⁶-LHRHa; Des-Gly¹⁰-LHRHe; Estradiol and OvaprimTM. Antiserum reaction between plasma samples and VTG were used additionally to VTG levels to identifying sex of wild and domesticated gars. Using the induction of reproduction and VTG-quantification methodologies, we have been able to obtain spawns for four consecutive months (before restricted to two weeks). The use of LHRH analogs and OvaprimTM were effective inducing spawning, providing high fertilization and hatching rates. High larvae quality was observed and the lowest survival rate was 80 % at a density of 20 larvae per liter. The results of this study indicate that sex identification and spawns control is possible in tropical gars. The quality of the larvae obtained from early spawns was similar than that obtained during the normal period spawns. With this protocol, the reproduction events can be schedule along several months instead of the previous restricted two-weeks period used in past years. The results obtained in this study are very important for hatchery optimization, broodstock management, and personnel efficiency in farms.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la acuicultura ha surgido como un proceso relevante en la producción de alimentos a escala mundial. Aún cuando son varios los aspectos a considerarse durante la producción masiva de cualquier especie, tales como la nutrición, sistemas de engorda, enfermedades y otras. La habilidad de manipular los sistemas reproductivos de los peces es uno de aspectos esenciales y la base de cualquier sistema acuacultural (Sato *et al.*, 1992; Mylonas *et al.*, 1998), ya que permite la producción continua y predecible de crías para su abastecimiento. De igual manera, su control es imprescindible para la repoblación de áreas de pesca tradicionales y zonas ecológicamente impactadas. Esto es posible solo cuando se llega a tener control sobre los tiempos de producción de gametos en los grupos de reproductores. Adicionalmente, si el confinamiento se realiza en los periodos más apropiados para su manejo, se pueden lograr desoves múltiples más de una vez al año, optimizando el uso de las instalaciones destinadas para esta finalidad y minimizando los costos de operación por unidad de producción (Cierezko, *et al.*, 1997; Patiño, 1997).

Dicho control puede establecerse mediante dos alternativas: la manipulación ambiental y la inducción hormonal. En el primer caso, se tiene la ventaja de que al manipular los factores ambientales en condiciones de cautiverio, se excluye el uso de cualquier tipo de sustancia química para este fin, sin embargo, puede resultar poco práctico, ya que se requiere de infraestructura y operaciones de manejo especiales. Esto indudablemente ha limitado su aplicación a pocas especies. Por otro lado, actualmente la utilización de hormonas homólogas y heterólogas viene a representar la forma más adecuada de control sobre varios aspectos del sistema reproductivo (Patiño, 1997). Así, el control sobre la reproducción brinda la posibilidad de utilizar estrategias que permitan satisfacer las demandas del mercado.

Dentro de las actividades relacionadas con este manejo reproductivo, es indispensable el reconocimiento del sexo de los grupos de reproductores. Esto permite administrar adecuadamente dichos grupos durante las fases de preparación y/o al momento del desove. En algunas especies el reconocimiento del sexo puede realizarse sin problemas cuando presentan dimorfismo sexual. En caso contrario, se pueden aplicar algunas técnicas

que implican la extracción de gametos como la canulación, punción ovárica o cirugía. En este caso, la identificación se realiza a través del reconocimiento de estas células. En algunas especies la obtención de dichas muestras puede presentar pocos problemas; sin embargo, en otras, estas prácticas pueden causar lesiones o ser la vía posible para la aparición de infecciones y enfermedades. Igualmente el manejo traumático al que son sometidos los organismos puede provocar estrés, lo cual tiene un efecto adverso en la calidad de los desoves.

El pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) es un pez que habita en las áreas pantanosas del sureste de México, siendo de gran importancia ecológica en estas áreas (Contreras, 1990).

Desde el punto de vista económico la especie tiene gran demanda en el mercado de la región, ya que es apreciado en la preparación de platillos tradicionales, en la elaboración de artesanías y actualmente tiene un potencial importante como especie de ornato.

En relación al manejo de esta especie en condiciones de cautiverio, se ha venido generando información respecto a las diferentes fases de su cultivo. Esto ha permitido avances importantes entorno a su incorporación a las prácticas acuícolas. Sin embargo, uno de los problemas relevantes para su manejo reproductivo consiste en la dificultad de identificación del sexo debido a que no presenta dimorfismo sexual aparente. Esto repercute en el reconocimiento de machos y hembras, en la planificación de los desoves y en la evaluación del estadio de madurez de los ejemplares.

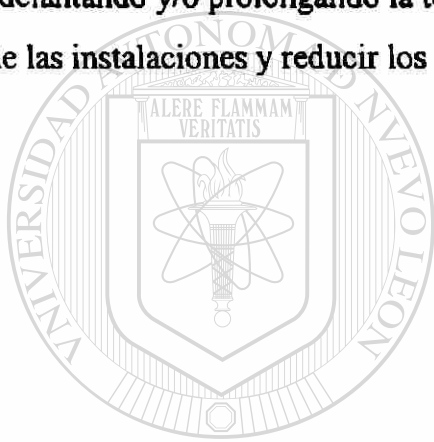
Debido a lo anterior, en el presente trabajo se plantea la necesidad de establecer un control reproductivo sobre lotes en cautiverio de pejelagarto. Para establecer dicho control, inicialmente se presenta una metodología para la identificación del sexo de ejemplares adultos mediante la identificación y cuantificación de vitelogenina (VTG) plasmática. Posteriormente, se propone el uso de los niveles de la VTG como indicador de la susceptibilidad al desove de hembras de pejelagarto.

La relevancia de este trabajo radica en que los resultados de esta investigación pueden ser aplicados en los programas de reproducción del pejelagarto *Atractosteus tropicus*, con el objetivo de incrementar los volúmenes anuales de producción de cría de esta especie, las cuales pueden ser destinadas a programas de restauración de poblaciones silvestres, ser mantenidas en cultivo hasta la talla comercial para la producción de carne y

fines de ornato. Lo cual permitiría mantener las poblaciones silvestres en niveles aceptables para continuar con la pesca comercial y a la vez reducir las presiones sobre estas poblaciones, al proveer al mercado mediante organismos producidos en sistemas de cultivo.

Es necesario considerar que *A. tropicus* es una especie de interés comercial y cultural en la región sureste de México, misma que en los últimos años ha sido sometida a una pesca sostenida que puede provocar un agotamiento de las fuentes naturales de abastecimiento.

A pesar de que actualmente existe un programa de producción de crías de *A. tropicus* basado en el aprovechamiento de la temporada de reproducción, la capacidad de producción puede ser incrementada ejerciendo el control sobre la reproducción, adelantando y/o prolongando la temporada de desove, con la finalidad de maximizar el uso de las instalaciones y reducir los costos de producción de crías.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar un protocolo adecuado para la identificación del sexo y madurez gonadal de lotes de reproductores de *A. tropicus* en cautiverio, para planificar la inducción al desove.

ESPECIFICOS

1. Estandarizar un inmunoensayo para cuantificar VTG de pejelagarto en la temporada reproductiva a partir de anticuerpos contra esta molécula obtenidos de la proteína purificada
2. Determinar el sexo de organismos de poblaciones naturales y en cautiverio de pejelagarto mediante la cuantificación los niveles de VTG plasmática.
3. Evaluar la respuesta fisiológica de adultos en cautiverio sometidos a diferentes protocolos de inducción hormonal para lograr la maduración gonadica y el desove.
4. Evaluar la calidad de los desoves de pejelagarto obtenidos por inducción hormonal fuera de la temporada normal de reproducción.

3. ANTECEDENTES

3.1. ROL DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA REPRODUCCIÓN.

Como en muchos vertebrados, los procesos reproductivos están controlados por ritmos biológicos endógenos, coordinados por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual está influenciado por factores ambientales determinantes, como son la calidad del agua, disponibilidad de alimento y la predación. Igualmente, existen otro tipo de factores que resultan condicionantes y dentro de estos se pueden considerar: el fotoperiodo, la temperatura y sus cambios direccionales, disponibilidad de substratos para el desove, feromonas, etc. (Redding y Patiño, 1993). Sin embargo, también algunos factores pueden actuar como estresores inhibiendo el proceso reproductivo (Reddy *et al.*, 1998).

Dentro del esquema general de integración de estos factores, los estímulos ambientales son inicialmente detectados por receptores localizados en los órganos sensoriales como los ojos, órganos olfatorios y glándula pineal; donde posteriormente, son traducidos por el sistema nervioso central en señales fisiológicas (hormonas) que provocan una respuesta en algún tejido específico del cuerpo (Patiño, 1997).

3.2. CONTROL HORMONAL DE LA REPRODUCCION

3.2.1. Función de la Hipófisis (Glándula Pituitaria)

La hipófisis está localizada en la base del hipotálamo y se encarga entre otras funciones de regular la reproducción a través de la producción de *Gonadotropinas* o GtH, mediante células especializadas conocidas como gonadótropas. La actividad de estas células está coordinada por un factor estimulador muy potente que es producido en el hipotálamo y se conoce como *Hormona Liberadora de las Gonadotropinas* (GnRH). Estas moléculas están compuestas por una cadena de 10 aminoácidos (Peter, 1983; Zohar, 1998); y hasta el momento existen varias formas que han sido identificadas en peces, como la [Trp⁷,Leu⁸]-GnRH de salmón o sGnRH y la [His⁵,Trp⁷,Leu⁸]-GnRH de pollo o cGnRH (Yaron, 1995).

En algunos teleosteos, la dopamina actúa como un factor inhibidor de la liberación de las gonadotropinas (GRIF). La producción de la GtH por la hipófisis está controlada por sistemas de retroalimentación negativa y positiva relacionados con los niveles de secreción de la hormona, así como de sus activadores e inhibidores (Crim *et al.*, 1983). La importancia de la hipófisis como mediadora del proceso reproductivo ha quedado de manifiesto en experimentos en los cuales al realizar la ablación de esta glándula, se produce regresión de las gónadas, decremento de la gametogénesis e inhibición de la esteroidogénesis al nivel de la gónada. Igualmente, numerosos estudios han correlacionado el incremento en la concentración de las GtH en las gónadas y la hipófisis con el desarrollo gonadal, maduración en hembras y machos, así como en el desove de muchas especies de peces. Dentro de este contexto, destaca el hecho de que en un gran número de especies, al ser tratadas con moléculas GtH-like, se promueve el proceso reproductivo, particularmente durante periodos en los que los peces están reprimidos por los factores ambientales que pueden inclusive llevarlos al desove.

En los teleosteos se producen dos tipos de GtH, las cuales se conocen como GtH-I y GtH-II, denominadas así tanto por sus características estructurales, como por su modo de acción (Swanson, 1991 en Patiño, 1997). La GtH-I es estructural y funcionalmente comparable a la hormona folículo estimulante (FSH) de los mamíferos y se destaca por presentar niveles de concentración predominantes en la hipófisis y sangre de los peces que presentan un crecimiento acelerado de las gónadas y gametogénesis activa. En contraste la GtH-II, al igual que la hormona leutinizante (LH) es predominante, principalmente, durante la maduración final de las gónadas y el desove. La acción de ambas hormonas está mediada por receptores ubicados en la membrana de los ovocitos (Redding y Patiño, 1993).

3.2.2. Estructura y Función de las Gónadas.

El conocimiento de la anatomía de las gónadas es esencial para entender la fisiología de las mismas. Las gónadas están constituidas por células germinales y células somáticas, las cuales nutren, dan soporte y regulan el desarrollo de las células germinales. Los conductos gonádicos están presentes en la mayoría de las especies y funcionan permitiendo el flujo de los gametos a su destino, que puede ser el interior o exterior del organismo. Existen diferentes variaciones estructurales en la mayoría de las especies, las

cuales reflejan patrones evolutivos y adaptaciones específicas para cada ambiente (Nagahama, 1983; Redding y Patiño, 1993).

Testículos.

Los testículos contienen células germinales en estadios de desarrollo variables o sincrónicos y presentan igualmente células complementarias especializadas en el soporte físico y la regulación de la espermatogénesis. Así, las células de Sertoli se encuentran en asociación directa con las células germinales brindándoles soporte y modificando su microambiente. Por otro lado, las células de Leydig producen los esteroides necesarios para el desarrollo del programa espermatogénico y la expresión de los caracteres sexuales secundarios.

Los testículos de los teleosteos, son generalmente pareados, bilaterales y tienen una organización tubular o lobular, dentro de las cuales las células germinales se desarrollan parcialmente embebidas en las células de Sertoli (Nagahama, 1983). De acuerdo con Grier (1990), en la mayoría de los teleosteos, la actividad mitótica de las espermatogonias está organizada en lóbulos localizados a lo largo del segmento tubular. Los espermatozoides maduros son liberados en el lumen central, el cual eventualmente los conduce a los ductos eferentes que terminan en la apertura urogenital. La producción de esperma en algunos teleosteos es un evento sincrónico, mientras que en otros es cíclico o continuo (Redding y Patiño, 1993).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Ovarios.

Los ovarios en los peces generalmente son pareados y están unidos a la cavidad del cuerpo o sobre cualquiera de los lados del mesenterio, aunque pueden existir algunas excepciones (Nagahama, 1983). Los patrones de desarrollo del ovario que hasta ahora se conocen son tres: sincrónicos, grupos sincrónicos y asincrónicos (Gorbman, 1983). En el patrón sincrónico, todos los ovocitos se desarrollan al mismo tiempo, llevando a un evento ovulatorio único. Por otro lado, en el de grupos sincrónicos, existen dos o más grupos de ovocitos al mismo tiempo, y cada uno de estos grupos se puede encontrar en diferentes estadios de desarrollo; este patrón permite eventos de ovulación que son debidos a ciclos estacionales, lunares o diurnos. Finalmente, en el caso del patrón asincrónico se presentan

ovocitos en todos los estadios de maduración y permiten una ovulación continua (Redding y Patiño, 1993).

La estructura y crecimiento del folículo ovárico es muy similar en la mayoría de los peces. El ovocito en desarrollo está localizado en el centro del folículo y se encuentra rodeado por células foliculares. Esta capa de células foliculares consiste generalmente de una subcapa interna conocida como las células de la *granulosa* y una o dos subcapas externas; denominadas células de la *teca*. La teca y la granulosa están separadas por una membrana basal. Entre la superficie del ovocito y las células de la granulosa hay una capa no celular llamada la *zona radiata* (Redding y Patiño, 1993).

Esteroides de Origen Gonadal.

Los testículos y ovarios de peces son capaces de sintetizar una gran variedad de esteroides, los cuales regulan diversas funciones, incluyendo la gametogénesis, las actividades secretorias del hipotálamo y la hipófisis, la expresión de caracteres sexuales secundarios y la conducta (Fostier *et al.*, 1983).

Las células de Leydig parecen ser los sitios de mayor síntesis de andrógenos en el testículo, sin embargo las células de Sertoli y otros tipos celulares parecen también tener una función esteroidogénica importante. La mayor parte de los andrógenos producidos en el tejido testicular varía en cada especie y en función de la etapa de desarrollo, pero en general se han detectado: testosterona, 11-ketotestosterona y androstenediona (Fostier *et al.*, 1983), aunque en algunas especies el testículo también pueden producir progesterona, 17α -hidroxi-4-pregnen-3-ona, 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, 11-progesterona y pequeñas cantidades de estrógenos (Barry *et al.*, 1993 en Redding y Patiño, 1993).

En el ovario, la teca y la granulosa son los principales centros de producción de esteroides y sus productos son: 17β -estradiol, estrona, 17α , 20β , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona y además todos los esteroides producidos por el testículo, dependiendo de la especie y estado de desarrollo (Fostier *et al.*, 1983). Los esteroides tanto en machos como en hembras se pueden conjugar en glucoronoides o con metabolitos inactivos, de tal manera que pueden estar disponibles para su reactivación, aunque se cree que pueden tener una función como feromonas en la comunicación previa y durante el cortejo reproductivo y el desove (Redding y Patiño, 1993).

El efecto de los esteroides es muy diverso y está mediado por la interacción con receptores de alta afinidad localizados en el citoplasma o en la cromatina nuclear de las células blanco que al interactuar con estos cambian las tasas transcripcionales de genes específicos, induciendo la respuesta a nivel de la célula (Redding y Patiño, 1993).

3.2.3. Gametogénesis:

Espermatogénesis

Los cambios característicos en la célula durante la espermatogénesis incluyen la proliferación mitótica de las espermatogonias y la subsecuente diferenciación de algunas de estas en espermatoцитos primarios. La primera división meiótica marca la conversión de espermatoцитos primarios en secundarios, mismos que posteriormente mediante una segunda división meiótica se convertirán en espermátidas. Durante la espermiogénesis, las espermátidas maduran, desarrollan el flagelo y se separan de sus células de Sertoli de apoyo para convertirse en espermatozoides. Los espermatozoides son colectados en los túbulos eferentes de los cuales saldrán durante la espermiación. La sincronización de la espermatogénesis se lleva a cabo de tal forma, que los clones de espermatozoides y sus células de Sertoli se desarrollan en una estricta asociación tanto espacial como temporal dentro del túbulo o espermatoцисто del testículo (Redding y Patiño, 1993). Los mecanismos de regulación hormonal de la espermatogénesis incluyen la proliferación de las espermatogonias inducidas por la GtH y la esteroidogénesis testicular en las células de Leydig, o en algunas especies en las células de Sertoli.

Ovogénesis.

La mayor parte del crecimiento en el ovocito de los vertebrados ocurre durante el periodo posterior a la primera división meiótica, cuando la célula se encuentra bloqueada en profase I. Durante la maduración, continúa la meiosis pero esta se detiene nuevamente en metafase II, este bloqueo terminará en el momento en el que el huevo sea fertilizado. El crecimiento del ovocito se debe a la captación de *Vitelogenina* (VTG) de la circulación, la cual es modificada y posteriormente depositada como vitelo en el huevo. La VTG se produce en el hígado como respuesta a una alta concentración de estradiol en circulación

producido por las células foliculares ováricas y mediada por la acción de las GtH (Sundararaj *et al.*, 1982; Nagahama, 1983; 1990; Nagahama *et al.*, 1993). Esta proteína, presenta un peso molecular muy variable en las diferentes especies, dependiendo de la técnica empleada para determinarlo; siendo de 520 kDa en *Verasper moseri* (Matsubara *et al.*, 1999); 455 kDa en *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994b); 350 kDa en *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1994) mientras que en *Plectropomus leopardus* se ha identificado con 180 kDa (Takemura y Teruya, 1997) y en *Mycteroperca microlepis* de 183 kDa (Heppell y Sullivan, 1999).

Una vez liberada por los hepatocitos, la VTG de la circulación, es captada por los ovocitos en crecimiento mediante endocitosis mediada por receptores específicos y posteriormente transformada enzimáticamente en proteínas de menor peso molecular, como la lipovitelina, fosvitina y fosbetas o β -componentes (Tyler *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1991; Matsubara y Sawano, 1995; Matsubara y Koya, 1997).

Culminada la captación de VTG, inicia la maduración final ovocitaria (FOM) con la migración de la vesícula germinativa hacia la periferia y la subsecuente ruptura de la vesícula germinal (GVBD). Esta etapa está controlada por la GtH-II, a través de la acción de la 17, 20 β -Progesterona y la 17, 20 β , 21 Progesterona (Mylonas *et al.*, 1997; Patiño y Thomas, 1990). Posteriormente, ocurre la ovulación en la cual se produce una separación entre el folículo y el ovocito, como consecuencia de la hidratación de éste. Esta separación es seguida por la ruptura de la capa de células foliculares y la expulsión del huevo.

El desove es la culminación de los eventos fisiológicos y de conducta que permiten la fusión de los gametos.

3.3. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO Y EVALUACIÓN DE LA MADUREZ EN PECES.

Comúnmente las técnicas de identificación del sexo en muchas especies de peces están relacionadas con la evaluación del dimorfismo sexual, que incluye la observación de características distintivas de forma, color o aparición de ciertas estructuras en el cuerpo (Kucharczyk *et al.*, 1998). Generalmente, esta forma de identificación puede presentar

pocos inconvenientes; sin embargo, la aparición de estos caracteres puede estar condicionada a la temporada reproductiva, al desove o bien no presentarse en ningún momento. Esto último, implica que la identificación puede tener limitaciones o no puede realizarse con facilidad, causando dificultades en el manejo de lotes de reproductores en las granjas de producción. En este sentido, una alternativa para este problema es el uso de métodos llamados “invasivos” que implican la extracción de tejido de la gónada para el reconocimiento de los tipos celulares presentes y al mismo tiempo realizar la evaluación de la madurez de dichos gametos (Alvarez-Lajonchere *et al.*, 2001). Comúnmente se emplea la canulación, punción ovárica o cirugía. La primera consistente en introducir un tubo de calibre adecuado a través del poro genital y conducirlo a través de los conductos hasta la gónada para extraer el tejido. Por otra parte, la punción ovárica requiere generalmente el uso de una jeringa con aguja de calibre adecuado; esta se introduce directamente en la cavidad peritoneal y en la posición correcta para alcanzar la gónada. La cirugía implica abrir la cavidad abdominal y extraer una porción de la gónada para ser evaluada. Estos métodos han sido empleados con éxito en muchos grupos de peces, pero la aplicación de estos requiere que las especies presenten ciertas características anatómicas y de resistencia hacia la manipulación en función del método a emplear. Las desventajas de estas técnicas, están asociadas al estrés excesivo y trauma ocasionados por la manipulación y a que pueden propiciar daños parciales o permanentes en los tejidos debido a lesiones e infecciones oportunistas. En el último de los casos se recurre al sacrificio, lo cual no es permisible cuando los reproductores son escasos.

Alternativamente para la identificación del sexo se han empleado evaluaciones de diferentes sustancias presentes principalmente en la sangre y que son distintivas; o bien, presentan concentraciones diferenciales en machos y hembras durante la maduración gonádica. Dentro de estos componentes se pueden mencionar las hormonas esteroides (Chiba *et al.*, 1994; Matsubara *et al.*, 1995; Taranger *et al.*, 1998); el calcio plasmático (Nagler *et al.*, 1987; Linares-Casenave, 1990; Doroshov, *et al.*, 1997; Björnsson *et al.*, 1998); Fósforo ligado a proteínas alcali-lábiles o ALPP (Craig y Hervey, 1984; Nagler *et al.*, 1987); Proteínas específicas del suero de hembras o FSSPs (Takemura *et al.*, 1991; Fujita *et al.*, 1998); proteínas del moco (Chang *et al.*, 1996), así como la presencia o

ausencia de VTG para identificar a hembras y machos; además de la concentración de la misma proteína para relacionarla con el estadio de madurez gonadal (Le Bail y Breton, 1981; Mañanós *et al.*, 1994a; Matsubara *et al.*, 1994, 1995; Takemura y Oka, 1998; Fujita *et al.*, 1998; Heppell y Sullivan, 1999).

Para la identificación de la VTG generalmente se emplean anticuerpos contra la misma (Le Bail y Breton, 1981; Linares-Casenave, 1993); mientras que para su cuantificación se emplean técnicas directas e indirectas. Las técnicas directas se basan en el uso de anticuerpos específicos y dentro de estas se incluyen el radioinmunoensayo (Tyler *et al.*, 1990); inmunoensayos enzimáticos (Pacoli *et al.*, 1990; Matsubara *et al.*, 1994; Mañanós *et al.*, 1994a; Matsubara *et al.*, 1995); inmunodifusión radial (Takemura *et al.*, 1991; Chiba *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1998), entre otros. Por otro lado, las indirectas se basan principalmente en la relación proporcional que existe entre el contenido de VTG y el calcio plasmático total (Nagler *et al.*, 1987; Linares-Casenave, 1993) o el fósforo ligado a proteínas lábiles a alcali (Craik y Harvey, 1984; Nagler *et al.*, 1987).

3.4. AGENTES INDUCTORES DE LA MADURACIÓN Y DESOVE UTILIZADOS EN ACUACULTURA.

Los análogos superactivos de la GnRH comúnmente utilizados para este fin, son los que tienen sustituido el L-aminoácido de la posición 6 por un D-aminoácido, además de que la glicina del carboxilo terminal es reemplazada por la etilamida, con lo cual son más resistentes a la acción enzimática de la pituitaria, hígado y riñon; lo cual les confiere una acción biológica más potente (Yaron, 1995). Uno de los análogos más efectivos es la [D-Arg⁶, Pro⁹-Net]-GnRH de salmón o sGnRH-A, el cual se aplica comúnmente combinado con antagonistas de los receptores de la dopamina (DA) como la metoclopramida, domperidona y el pimozido (Yaron, 1995), o sin estos (Alok *et al.*, 1993). Sin embargo, los resultados pueden ser variables en función de los tiempos y grado de madurez natural de la especie (Fitzpatrick, 1987).

Los métodos de aplicación pueden ser variados; desde la inyección, el suministro mediante el alimento o mediante sistemas de liberación prolongada como los implantes,

cuya utilización permite minimizar el manejo de los ejemplares (Crim *et al.*, 1983; Redding y Patiño, 1993; Yaron, 1995; Berlinsky *et al.*, 1996; Patiño, 1997; Watanabe *et al.*, 1998a) y evitar los efectos negativos del estrés (Mylonas *et al.*, 1998). La administración de este tipo de análogos produce una elevación en los niveles de gonadotropinas en los peces por incremento de su síntesis (Crim *et al.*, 1983), como ha sido observado en *Morone saxatilis* (Mylonas *et al.*, 1998). Igualmente repercuten sobre los niveles de andrógenos (Sower *et al.*, 1984) que pueden estar involucrados en el proceso de ovulación (Cierezko *et al.*, 1997). En algunas especies los mejores resultados se obtienen cuando los organismos se han sometido previamente a un régimen fototérmico especial como en *Heteropneustes fossilis* (Alok *et al.*, 1994); *Perca flavescens* (Cierezko *et al.*, 1997) y *Paralichthys dentatus* (Watanabe *et al.*, 1998a).

Las dosis son variables y dependen de la forma de aplicación. En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de LHRHa, Antagonistas de la Dopamina y métodos usualmente empleados con éxito en la inducción al desove, por citar algunos.

Tabla 1. Resumen de las dosis y métodos de aplicación de análogos superactivos utilizados en hembras de especies de interés acuacultural.

Especie	Dosis/kg Análogo	Dosis/kg Pimozido	Método	Fuente:
<i>Ictalurus punctatus</i>	100µg	100 mg	Inyección	Silverstein <i>et al.</i> , 1999
<i>Clarias macrocephalus</i>	0.05µg	1µg	Inyección	Tan-Fermin <i>et al.</i> , 1997
<i>Heteropneustes fossilis</i>	25-500µg ¹	-	Inyección	Alok <i>et al.</i> , 1993;1994
<i>Micropterus s. floridanus</i>	500µg	-	Inyección	Mayes <i>et al.</i> , 1993
<i>Morone chrysops</i>	50µ/pez	-	Implante	Mylonas <i>et al.</i> , 1997
<i>Paralichthys dentatus</i>	100µg	-	Implante	Watanabe <i>et al.</i> , 1998a
<i>Scophthalmus maximus</i>	75µg	-	Implante	Mugnier <i>et al.</i> , 2000

¹sGnRH_a

La hipofización es otra herramienta para inducir el desove en peces, cuando las hipófisis, ya sea frescas o deshidratadas en acetona están disponibles. Aunque, resulta

efectiva en la mayoría de los casos, esta técnica presenta algunas desventajas, ya que las hipófisis generalmente son de diferente tamaño y el contenido de gonadotropinas puede ser variable, dependiendo del estado de madurez del donador, lo que hace difícil establecer la dosis adecuada. No obstante, actualmente se encuentran disponibles productos con actividad conocida (Yaron, 1995). Por otra parte, esta técnica resulta ventajosa, ya que resulta económica comparada con la utilización de otros químicos sintéticos o purificados. Frecuentemente, se utilizan los extractos de homogenizados de pituitarias de carpa, los cuales pueden ser altamente efectivos ya que aparte de las GtH contienen otras hormonas con efecto positivo durante la reproducción como la prolactina, hormona del crecimiento y hormona estimuladora de la tiroides (Berlinsky *et al.*, 1997). En los machos los resultados se reflejan incrementando el volumen de semen como en *Exos masquinongy* (Lin *et al.*, 1996). También pueden usarse pituitarias de alguna especie disponible o de bajo costo como la tilapia que usándose a razón de 8 mg/kg promueven el desove en *Clarias gariepinus* y en *Heterobranchus bidorsalis* (Salami *et al.*, 1997). La experiencia indica que cuando el donador y el receptor son de la misma especie, la técnica es más efectiva.

Otra de las técnicas ampliamente difundidas es la utilización de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), la cual ha mostrado resultados positivos dentro de la temporada de reproducción en; *Micropterus salmoides floridanus* (Mayes *et al.*, 1993); *Exos masquinongy* (Lin *et al.*, 1996); *Epinephelus striatus* (Head *et al.*, 1996); *Paralichthys dentatus* (Berlinsky *et al.*, 1997) y *Lutjanus analis* (Watanabe *et al.*, 1998b).

3.5. BIOLOGÍA Y CULTIVO DEL PEJELAGARTO *Atractosteus tropicus*.

3.5.1 Biología General y Aspectos Ecológicos.

En México se distribuyen dos especies del género *Atractosteus*; en el norte de la vertiente del golfo de México desde Tamaulipas hasta el estado de Veracruz *A. spatula* y en el caso de *A. tropicus* su distribución incluye la cuenca del río Usumacinta en Guatemala y México, Lago Nicaragua y río San Juan en Costa Rica (Espinosa *et al.*, 1993).

A. tropicus es un pez con cuerpo largo y cilíndrico de color entre verde y ligeramente grisáceo, cubierto de una sustancia mucilaginoso. Posee escamas romboides muy duras que cubren todo el cuerpo (Chávez *et al.*, 1989); siendo un organismo que puede alcanzar tallas mayores de 1 metro.

El pejelagarto es una especie típica de las áreas pantanosas, en este ambiente funge como el regulador primordial de las comunidades de peces y anfibios que constituyen su alimento (Contreras, 1990). Presenta hábitos alimenticios carnívoros; con actividad alimenticia principalmente por la noche. En los juveniles, los peces y los insectos constituyen la parte más importante de su dieta, mientras que en los adultos, los peces constituyen la dieta fundamental (Reséndez y Salvadores 1983; Chávez *et al.*, 1989); presentando estructuras óseas y digestivas típicas de la alimentación carnívora (Díaz, 1969).

Respecto a su conducta, estos organismos son poco gregarios, formando grupos únicamente durante las temporadas de reproducción y presentan poca agresividad (Alemán y Contreras, 1987).

Los trabajos relacionados con las etapas iniciales de vida en *A. tropicus* indican que la eclosión se presenta generalmente entre 35 a 48 horas después de la fertilización, emergiendo una prelarva que se adhiere a la vegetación mediante un disco adhesivo presente en la cabeza. Las larvas permanecen sujetas a la vegetación generalmente 4 días culminando su desarrollo larval (Contreras y Alemán 1987; Gómez, 1989). Este periodo de desarrollo, según las observaciones de Márquez (1998), está fuertemente influenciado por la temperatura, lo cual permite acelerarlo o prolongarlo, sin reducir la viabilidad de las larvas.

Las larvas de pejelagarto se alimentan básicamente de microcrustáceos acuáticos, larvas de insectos y pequeños peces que son abundantes en el ambiente natural (Contreras y Márquez; 1988). La alimentación exógena en laboratorio, inicia al quinto día después de la eclosión (Hernández, 1999); siendo empleado como alimento básico el nauplio de *Artemia*

(Rodríguez *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999; Márquez, 1998) que mejora notoriamente el crecimiento y supervivencia de las larvas.

En cuanto al cultivo de juveniles, existen algunas experiencias tendientes a desarrollarlo (Maldonado, 1991; Márquez *et al.*, 1997; Zacarías *et al.*, 1997). Actualmente, se ha venido practicando con éxito el cultivo a escala experimental en laboratorio, empleando el acondicionamiento gradual al consumo de alimentos balanceados como prerrequisito.

3.5.2. *Biología de la Reproducción.*

La talla de primera madurez de acuerdo con Chávez *et al.*, (1989) corresponde a 48.5 cm en las hembras y 42.5 cm en los machos. Los ejemplares de esta especie presentan un proceso de maduración sincrónica (Pérez, 1995; Pérez y Páramo, 1998). Se ha reportado que la temporada de desove inicia en el mes de marzo culminando en octubre. Sin embargo, aparentemente la ocurrencia de los desoves en las diferentes poblaciones del estado varía considerablemente a lo largo de la temporada; presentándose en algunas zonas en julio y en otras en septiembre

Los estudios realizados por Contreras y Alemán (1987) indican que los pejelagartos se reproducen preferentemente en los meses de inundación de las zonas pantanosas, lagunas y ríos; especialmente en temporadas con precipitaciones pluviales elevadas. Generalmente, las hembras encabezan los grupos de reproductores y prefieren, para el desove, zonas con gran cantidad de vegetación acuática o sumergida con profundidades entre 30 y 60 cm.

Los primeros ensayos sobre la reproducción en cautiverio de *A. tropicus*, corresponden a Contreras *et al.*, (1989) quienes acondicionaron áreas pantanosas para el desove. El estudio consistió en realizar la manipulación ambiental para semejar las áreas naturales de reproducción con lo cual se obtuvo el desove, pero la sobrevivencia de larvas fue reducida.

Uno de los problemas relacionado con el manejo reproductivo, ha sido la dificultad de determinar el sexo ya que no se presenta dimorfismo sexual en los ejemplares, por lo anterior Contreras y Marañón (1991) propusieron un modelo matemático basado en el análisis de parámetros morfométricos para la determinación del sexo; el modelo funciona con un 80% de confianza, pero solo con organismos silvestres con lo cual se reduce la aplicación a ejemplares de cultivo.

*3.5.3. Inducción al desove en *A. tropicus*.*

Hasta el momento las únicas experiencias en la inducción hormonal en *A. tropicus* corresponden a las efectuadas por Pérez (1995) utilizando hCG y a los trabajos realizados en el Laboratorio de Acuicultura (D.A.C.B.-UJAT) con Ovaprim-C. Este último producto se ha empleado a razón de 0.2 ml/kg con lo que se ha logrado el desove exitoso, siendo recomendable no emplear dosis altas como 0.5 mL/Kg ya que en ocasiones pueden llevar hasta la muerte de los ejemplares (Márquez, 1999). Estos trabajos se han realizado durante la temporada de desove natural de la especie; sin embargo, los criterios para definir los tiempos de las inducciones han sido subjetivos y basados en la experiencia con el manejo de los ejemplares; relacionando principalmente la temporada de desove en el sitio, abultamiento de la región abdominal de las hembras, cambio en peso de los ejemplares y conducta de los mismos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4- MATERIAL Y METODOS

4.1. CAPTURA Y ACLIMATACION DE ORGANISMOS.

Se emplearon ejemplares de pejelagarto mantenidos en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura de la UJAT, así como organismos capturados en la región sur del municipio del Centro, en el estado de Tabasco. Para la captura de los ejemplares de origen silvestre se utilizaron redes de monofilamento con una luz de malla de cuatro pulgadas. Las capturas se realizaron durante el periodo de Agosto 2000 a Mayo 2001, principalmente en zonas pantanosas y lagunas. Los ejemplares recién capturados fueron transportados al laboratorio, en donde fueron anestesiados con metasulfonato de tricaina a razón de 200 mg/L (Argent) para revisar su apariencia general y colocarles una marca numérica. Posteriormente los ejemplares fueron mantenidos en recipientes para su observación y aclimatación; durante este periodo fueron alimentados con una dieta basada en peces vivos (*Cichlasoma spp.* y *Dorosoma spp.* principalmente), la cual fue sustituida parcialmente por pescado fresco o congelado picado y finalmente por alimento balanceado para trucha (Trucha 45% de Proteína, 16% grasa, El Pedregal Silver Cup; Toluca, Méx.). Una vez transcurrido el periodo de aclimatación al cautiverio, los organismos fueron incorporados al estanque del lote de reproductores en donde fueron sujetos al siguiente esquema de alimentación: cuatro veces por semana alimento balanceado para trucha, dos veces con pescado fresco y un día sin alimento. El mantenimiento de la calidad del agua consistió en realizar recambios totales dos veces por semana con agua limpia y aireada.

4.2. DETERMINACION DEL SEXO DE EJEMPLARES DE *A. tropicus*.

4.2.1. Purificación de Vitelogenina Plasmática.

La vitelogenina fue purificada a partir de muestras de sangre de ejemplares macho de pejelagarto en los cuales se indujo la síntesis de la misma mediante inyecciones intraperitoneales de 17β Estradiol (Sigma) una emulsión de aceite de hígado de bacalao. La dosis de estradiol empleada fue de 10 mg/Kg. Los ejemplares fueron separados

previamente del lote de reproductores durante el desove de la temporada anterior. Para garantizar que se trataba de machos, se observó la conducta durante el desove y una vez identificados, fueron anestesiados para aplicarles presión abdominal y observar la presencia de semen. Los peces fueron mantenidos durante el tratamiento con estradiol en tanques de plástico de 2,000 litros de capacidad con agua limpia, alimentación a saciedad, aireación constante y bajo fotoperiodo y temperatura natural. Las inyecciones se llevaron a cabo de manera sucesiva a intervalos de una semana, hasta completar cuatro dosis. Al término del tratamiento se sacrificaron con una sobredosis de anestésico. La sangre se extrajo inmediatamente por punción de la vena caudal con una jeringa estéril (16G) conteniendo heparina sódica o EDTA como anticoagulantes.

Las muestras fueron transferidas a tubos de vidrio conteniendo inhibidores de proteasas: phenoximethylsulfonyl fluoride (PMSF) a razón de 1mM o bien Aprotinina al 0.01%; inmediatamente fueron centrifugadas a 5,000 rpm por 10 minutos y el plasma colectado se congeló a -20° C y posteriormente fue liofilizado para facilitar su manejo.

Para la purificación de la VTG, se empleó plasma liofilizado. Este fue inicialmente sometido a precipitación selectiva de acuerdo con el método de Wiley *et al*, (1979): Todas las etapas se realizaron a 4° C. A 200 mg de plasma liofilizado se rehidrataron con 6 mL de buffer Tris HCl 50 mM, PMSF 1 mM pH 8. Posteriormente se le agregaron 20 mL de EDTA 20 mM y se ajustó cuidadosamente el pH a 7.5 con NaOH 1N. Se agregaron 1.6 mL de MgCl 0.5 M y se centrifugó a 2500 x g durante 35 minutos a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se agregaron 6 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 1 M NaCl para resuspenderlo empleando una varilla de vidrio. La mezcla se centrifugó nuevamente a 2500 x g durante 35 minutos a 4° C. Se eliminó el precipitado y al sobrenadante se le agregaron 25 mL de agua destilada fría para ser centrifugado a 2500 x g 35 min. a 4 °C. El precipitado considerado como un semipurificado fue resuspendido en buffer Tris-HCl 50 mM, PMSF 1 mM pH 8.0.

La separación posterior de la VTG se realizó por cromatografía líquida de filtración en gel de Sepharose 6B o alternativamente por intercambio de iones en DEAE Sephacel en un gradiente de KCl. Filtración en Sepharose 6B: en este caso, la columna fue equilibrada con un buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1% NaCl, 1 mM de MgCl, 1 mM PMSF. Se inyectó 1 mL de muestra (1:1 de precipitado y buffer de corrida). La separación se llevó a cabo con

un flujo de 1 mL/min. Intercambio de iones: la columna se equilibro con buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1 mM PMSF. La muestra a inyectar se mezclo con el buffer de corrida 1:1 y se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 0.3 mL/min en un gradiente de 0 a 0.5 M de KCl. En ambos casos se colectaron fracciones de 4 mL a las cuales se les midió la absorbancia a 280 nm (Spectronic Genesis 2). Las fracciones en las que apareció el valor más alto de absorbancia se homogenizaron, se liofilizaron y se consideraron como VTG purificada.

Los liofilizados obtenidos del proceso de purificación, así como las muestras de los precipitados de plasma; plasma liofilizado y fresco de animales tratados y no tratados con estradiol fueron sometidos a electroforesis para observar el patrón de proteínas y evaluar el grado de purificación de la proteína inducida por este esteroide. Se empleó el método de gel discontinuo (gel almacenador y separador) de acuerdo con la técnica de Laemmli (1970); se utilizaron geles de poliacrilamida (PAA) en presencia de SDS. El gel almacenador se preparó a una concentración de 3.5% PAA y el separador a 6% PAA. Las electroforesis se realizaron en una cámara de electroforesis vertical (Owl Separation Systems Co.) con dos placas de 15 pozos. Las muestras aplicadas consistieron en una mezcla de volúmenes similares de buffer de muestra (Tris HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol y azul de Bromofenol 0.04%) y de solución preparada con el liofilizado, fracción cromatográfica o plasma fresco. En cada pozo se colocaron entre 30 y 40 µg de proteína total, la cual fue determinada como proteína soluble de acuerdo con el método de Bradford (1976). Para este último procedimiento se empleó como proteína de referencia albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 10 a 100 µg para la elaboración de una curva estándar mediante la lectura de la absorbancia a las preparaciones a 595 nm. Las muestras que fueron sometidas a electroforesis no fueron calentadas, con excepción del marcador de peso molecular. Se empleo el marcador hemocianina (Sigma SDS-PAGE MW) con subunidades de 70,000; 140,000; 210, 000 y 280, 000 KDa. Las electroforesis se realizaron a 100 V con una intensidad de 30 mA por gel durante 4 horas y la cámara fue conectada a un baño de recirculación para mantener una temperatura de 4° C. Una vez terminadas las electroforesis, los geles se sometieron a precipitación con una solución fría de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y a tinción de acuerdo con la metodología de Weber y Osborn (1969). Los geles se colocaron bajo agitación durante 60-90 minutos en una

solución de azul de Comassie R-250 preparado en una mezcla 40:10:50 de metanol, ácido acético y agua respectivamente. Para eliminar el exceso de colorante se empleó la misma solución base de la tinción sin el colorante. Posteriormente, cada gel fue sumergido brevemente en una solución con agua destilada, ácido acético y glicerol (88:10:2) y fue colocado sobre una placa de vidrio cubierta con papel celofán, se colocó otra hoja del mismo papel y se sometieron a deshidratación para su conservación.

El patrón de proteínas de los geles fue comparado y en base a esto, las fracciones purificadas en las que se observó una menor cantidad de bandas proteicas fueron empleadas en la generación de anticuerpos.

4.2.2. Obtención de Anticuerpos Policlonales.

Para la obtención de los anticuerpos se emplearon conejos de 600-800 gr. de peso, los cuales fueron inyectados con una mezcla de una solución de proteína purificada liofilizada y adyuvante de Freuma completo (Sigma). Se emplearon 200 µg de proteína los cuales fueron disueltos en 0.5 mL de solución salina estéril (NaCl 0.9%) y mezclados con 0.5 mL del adyuvante, esta mezcla se inyectó en diferentes partes del lomo de los conejos. Se realizaron inyecciones similares cada dos semanas durante un periodo de 2 meses (4 en total).

El título de anticuerpos fue evaluado a intervalos de dos semanas. Para esto se colectó 1 mL de sangre en la arteria de la oreja, la cual fue colocada en un tubo y se dejó coagular durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se mantuvo durante la noche en refrigeración y finalmente fue centrifugada a 5,000 rpm a 4° C durante 10 min. El suero colectado se conservó para las pruebas tipo Ouchterlony (1961). Estas se llevaron a cabo en placas de agarosa al 1% elaboradas sobre Gel-Bond (Farmacia) preparadas con buffer Tris-HCl 5 mM, pH 7.4, 150 mM NaCl y 0.02% de NaN₃. Una vez elaboradas las placas, se colocaron 10 µL de suero por pozo de diluciones seriales (1-1/64), mientras que en el centro se colocó una muestra de la proteína purificada. Las placas se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 48 hr., posteriormente fueron lavadas con una solución de NaCl al 1.5% en 4 cambios de 30 min. Los geles fueron prensados entre hojas de papel filtro y absorbente durante 16 hr. Para revelar las líneas de precipitación se empleo una tinción con azul brillante de comassie R-250 al 0.1% en etanol, ácido acético y

agua destilada en una proporción (40:10:50) durante 30 minutos y como decolorante se utilizó la misma solución sin agregar el colorante.

Después de realizadas estas evaluaciones, los conejos fueron sacrificados y se recuperó la totalidad del suero, el cual se congeló a -20°C para su posterior uso.

4.2.3. Pruebas Cruzadas

Las pruebas cruzadas iniciales se realizaron utilizando las mismas muestras de plasma de los ejemplares inducidos y no inducidos a la vitelogénesis con estradiol, de tal manera que como primer paso se observara el reconocimiento de antígeno aislado. Asimismo, se evaluaron los precipitados y fracciones cromatográficas obtenidas durante el proceso de purificación.

La siguiente fase de pruebas cruzadas preliminares fueron realizadas empleando muestras de plasma de 12 ejemplares silvestres colectados en la Reserva de la Biosfera "Pantanos de Centla" durante los meses de abril y mayo del 2001. En este caso, como los ejemplares fueron sacrificados en campo se conocía el sexo de los mismos. En estas pruebas se empleó metodología similar para la elaboración de las placas de agarosa a la descrita para el título de anticuerpos; en este caso sustituyendo la proteína purificada por $5\ \mu\text{L}$ de suero anti-VTG, mientras que en los periféricos se colocaron $5\ \mu\text{L}$ de plasma de los diferentes organismos por triplicado en diferentes placas. La incubación y tinción se realizaron de forma similar a la descrita con anterioridad.

Posteriormente, en la segunda semana del mes de mayo del 2001 se aplicó esta prueba a muestras de un total de 120 ejemplares mantenidos en laboratorio y de captura reciente, los cuales fueron marcados de manera que se pudieran separar por lotes con reacción positiva o negativa a la VTG purificada, considerándose así el primer acercamiento para identificar el sexo de los ejemplares vivos. Igualmente después de transcurrido un mes de la prueba inicial, la prueba se repitió nuevamente con muestras de plasma del mes de junio. Algunas de las muestras evaluadas en este paso fueron sometidas a electroforesis para constatar la presencia de la proteína inducida siguiendo la metodología señalada con anterioridad.

Los resultados de las pruebas de determinación preliminar del sexo mediante el reconocimiento de la proteína se emplearon para agrupar a organismos negativos como

machos y a los positivos como hembras durante la planeación y ejecución del experimento # 1 de inducción hormonal. Sin embargo los resultados del mismo indicaron la presencia de *falsos-positivos*, es decir ejemplares que en la prueba de reconocimiento de la proteína resultaron positivos a la VTG pero que en la revisión de las gónadas después del sacrificio se observó que presentaban testículos. Con los resultados anteriores se consideró imperativo realizar las pruebas de cuantificación de VTG como un medio para descartar a machos y hembras.

4.2.4. Cuantificación de la Vitelogenina plasmática.

Para la cuantificación de la vitelogenina se empleo la técnica de inmunodifusión radial simple (SRID) (Mancini et al, 1965). Las placas de agarosa al 1 % se prepararon con buffer Tris-Tricina-Lactato de calcio y 0.02% de NaN_3 como bacteriostático. Una vez mezclados, la solución se calentó para disolver la agarosa y cuando la temperatura estaba alrededor de los 45°C , se le agregó suero anti-VTG a razón de 100 μL por cada 100 mL de gel (1:1000). La curva estándar se preparó disolviendo la proteína purificada en buffer Tris-HCl 5 mM, pH 7.3, 150 mM NaCl y 0.02% de NaN_3 para obtener concentraciones desde 0 a 15 μg de VTG; mientras que las muestras de plasma fueron diluidas en el mismo buffer en proporción 1:1. En todos los casos, el volumen de muestra por pozo fue de 5 μL y se realizaron tres repeticiones. El procedimiento para la incubación, tinción y preservación del gel fue el mismo que el empleado en el apartado anterior.

La concentración de VTG fue calculada empleando la metodología de Matsubara y Sawano (1995); los diámetros de los círculos de inmunoprecipitación fueron medidos con un vernier (0.1 mm) y la concentración relativa del antígeno se calculó mediante un análisis de regresión lineal del área obtenida siguiendo la fórmula; $(\text{diámetro del círculo de inmunoprecipitación})^2 - (\text{diámetro del pozo})^2$.

La VTG fue cuantificada en aquellos ejemplares que en la prueba de reconocimiento de la VTG resultaron positivos, para descartar a los falsos-positivos con baja concentración de esta proteína (machos). Como método inicial para descartar a estos machos, se evaluaron los diámetros de los círculos de inmunoprecipitación (análisis subjetivo) con objeto de reducir el número real de muestras a aquellas dentro del rango en

el que se encontraron las hembras “verdaderas” del experimento # 1. Posteriormente, se realizó una nueva cuantificación y los resultados de esta, se emplearon en la planeación del experimento #2.

4.3. INDUCCION AL DESOVE DE *A. tropicus*.

En los experimentos se emplearon ejemplares de pejelagarto del lote original del Laboratorio de Acuicultura o los capturados en la temporada de desove del 2000; prescindiendo de aquellos capturados en meses recientes con la finalidad de evitar efectos relacionados con el estrés de su captura, transporte y aclimatación al laboratorio.

Considerando la disponibilidad de ejemplares de laboratorio, antes de iniciar los experimentos de inducción, se sacrificaron 4 ejemplares (2 positivos y 2 negativos al suero anti-VTG) para la revisión de las gónadas. Los ejemplares se sacrificaron con una sobredosis de anestésico, se obtuvieron sus datos morfométricos y se extrajeron las gónadas las cuales fueron pesadas y sometidas inmediatamente a fijación en líquido de Bouin por 24 horas; posteriormente se conservaron en alcohol etílico 70% para la preparación histológica convencional.

4.3.1. Experimento 1. *Evaluación del 17 β estradiol y el análogo superactivo des-Gly¹⁰ - (D- Ala⁶) LHRH ethylamide para inducir el desove en ejemplares de pejelagarto.*

Este bioensayo inició el 8 de julio del 2001, se diseñó considerando que al ser los primeros meses de la temporada reproductiva de la especie en la localidad y que los ejemplares del laboratorio en años anteriores desovaron exclusivamente en la segunda semana del mes de agosto, estos pudiesen estar en fase de maduración de la gónada siendo posible acelerarla inyectando estas hormonas a las hembras.

En este experimento fueron utilizados ejemplares de los lotes que en las pruebas cruzadas iniciales resultaron positivos para la reacción con el suero anti-VTG. Los organismos fueron agrupados basándose en su peso y la prueba cruzada con el suero anti-VTG. Lo cual arrojó un total de 9 ejemplares positivos y 18 negativos. El diseño experimental consistió en tres tratamientos con tres réplicas; debido a la disponibilidad de

animales, solo se empleo 1 ejemplar positivo y 2 negativos por réplica. Las hormonas empleadas fueron 17- β estradiol y des-Gly¹⁰ - (D- Ala⁶) LHRH etilamida (*Des-Gly*) a una dosis de 2 mg y 35 μ g por kilogramo de peso respectivamente y el tratamiento control (CT) inyectado con el vehículo exclusivamente. Los ejemplares fueron anestesiados con MS-222 e inyectados en la cavidad peritoneal; las inyecciones se efectuaron en el día de inicio del tratamiento (día 0) y un segundo refuerzo en el día 8 bajo la misma condición; en el día 16 de experimentación los ejemplares tratados con hormonas sin desovar y así como el control recibieron una inyección con OvaprimTM (Syndel) a razón de 0.2 mL/Kg.

TRATAMIENTOS	Dosis por Kg.		
	Día 0	Día 8	Día 16
17- β Estradiol	2 mg	2 mg	Ovaprim TM 0.2 mL
des-Gly ¹⁰ - (D- Ala ⁶)e	35 μ g	35 μ g	Ovaprim TM 0.2 mL
Control	vehículo	vehículo	Ovaprim TM 0.2 mL

Transcurridas 24 horas de la inyección con Ovaprim, los ejemplares tratados que no desovaron fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico para revisar la gónada.

4.3.2. Experimento 2. Inducción al Desove de Pejelagarto mediante la inyección de los Análogos Superactivos des-Gly¹⁰ - (D- Ala⁶) LHRH ethylamide y D-Ala⁶ - LHRHa.

En la selección de los ejemplares empleados en este bioensayo se utilizaron los resultados obtenidos de las pruebas cruzadas con el suero anti-VTG así como los de la cuantificación de la VTG plasmática. Las hormonas empleadas fueron seleccionadas en base a los resultados del experimento 1 y se administraron a una dosis de 35 μ g/Kg de peso en una sola aplicación. El experimento consistió en tres tratamientos con tres réplicas; des-Gly¹⁰ (*Des-Gly*), D-Ala⁶ (*D-Ala*) y control (CT); en cada unidad experimental se emplearon 1 hembra con 2 machos.

El bioensayo de inducción inició el 2 de agosto del 2001 y finalizó a las 48 horas. Los ejemplares tratados con las hormonas y que no desovaron, fueron sacrificados,

mientras que los del tratamiento control fueron inyectados: 2 ejemplares con des-Gly¹⁰ LHRHe y 1 con D-Ala⁶ LHRHa para evaluar su respuesta.

4.3.3. Preparación de las Inyecciones.

Las inyecciones se prepararon de la siguiente manera: previamente se prepararon soluciones stock de las hormonas seleccionadas empleando etanol al 50% con agua estéril (Alvarez y Hernández, 2001); una vez disueltas, se mantuvieron en congelación hasta su uso. En base a los pesos previos de los ejemplares obtenidos en la última biometría, se preparó una emulsión hormonal para lo cual se tomaron las alícuotas necesarias de stock para cada dosis, justo antes de aplicar el tratamiento se mezclaron con aceite de hígado de bacalao en proporción 1:3 (stock:aceite), para lo cual se utilizó una jeringa estéril para facilitar la integración. Una vez preparada la emulsión, se aplicaron las inyecciones.

4.3.4. Acondicionamiento de los Tanques para el Desove.

Debido a la disponibilidad de espacios para el desove, se emplearon tres tipos de tanques: piletas de concreto de 3 x 2 m; tanques de plástico rígido de 1.95 y de lona de 2.95 m de diámetro respectivamente (3 en cada caso). A cada uno de los recipientes se les agregó agua hasta un nivel de 45 cm aproximadamente, para lo cual se empleó agua limpia. El sustrato para los huevos consistió en grupos de manojos de hilo-fibra de plástico (rafia) de 40 cm de longitud los cuales fueron sujetos a tubos de PVC con contrapeso para mantenerlos en el fondo. El sustrato fue previamente sometido a un baño con una solución de yodo desinfectante a razón de 0.1:300 L de agua por 120 min. y posteriormente fue lavado con agua corriente.

Cada tercer día se realizaron recambios parciales del agua a razón 30% en cada tanque.

4.3.5. Evaluación de la Respuesta a la Inducción.

Esta consistió en realizar una revisión de los siguientes aspectos:

- a) *Ovulación y Ocurrencia del desove.* En este caso se realizaron observaciones periódicas (2-3 horas) después de aplicadas las inyecciones para observar la

conducta reproductiva y la ocurrencia del desove. Para evaluar la respuesta de ovulación, transcurrido el tiempo en que se esperaba el desove (12 horas), las hembras fueron anestesiadas y se les aplicó presión abdominal para observar si ocurría la expulsión de huevos.

- b) *Tasa de Fertilización.* En cada desove se tomó una muestra aleatoria de 100 huevecillos, los cuales fueron revisados bajo el microscopio para establecer si ocurría o no el desarrollo embrionario. Esta revisión se realizó siempre dentro de las primeras 4 horas de la fertilización para garantizar que los huevos se encontraran en estadio de blástula.
- c) *Diámetro y Peso de los Huevos Fertilizados.* Se emplearon muestras de 100 huevos de cada uno de los desoves los cuales fueron pesados en una balanza analítica y su diámetro fue medido con un micrómetro de ocular calibrado en un microscopio estereoscópico.
- d) *Tasa de eclosión.* A partir de cada desove se tomaron tres muestras, cada una de 200 huevecillos, las cuales fueron incubadas por 48 horas en tinas de plástico a una densidad de 50 huevos/L con agua limpia y aireación constante. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el sustrato de los recipientes y se realizó un conteo directo de las larvas.
- e) *Crecimiento y Supervivencia a la Primera Alimentación.* Las larvas sobrevivientes de la prueba anterior, fueron transferidas a otra tina con agua limpia y mantenidas bajo las mismas condiciones hasta la primera alimentación para un nuevo conteo y toma de los datos morfométricos. En este caso las larvas se midieron con un vernier con una precisión de 0.1 mm.

4.3.6. Cultivo de Larvas

La evaluación de este parámetro consistió en realizar un biensayo de crecimiento empleando las larvas de primera alimentación obtenidas de los desoves previos. El seguimiento de los desoves se realizó de forma individual para cada hembra. Las larvas obtenidas fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro replicados de 80 ejemplares cada uno. Las larvas se colocaron en tinas plásticas a razón de 20 ejemplares por litro con agua

limpia y aireación constante. Se siguió el esquema de alimentación propuesto por Hernández (1999) consistente utilizar nauplios, juveniles y adultos de *Artemia salina*, realizando algunas modificaciones de ajuste en el tamaño del alimento en función de la edad de los organismos y finalmente emplear biomasa congelada de *Artemia*. El alimento se suministró tres veces por día a saciedad.

Diariamente se realizaron recambios de 30% del agua y 100% cada semana. La evaluación duró 13 días, al término de los cuales la totalidad de los ejemplares fueron contabilizados. Al inicio y al final de esta evaluación se tomaron los datos morfométricos (longitud total y peso) de una muestra de larvas.

4.4. ANALISIS ESTADISTICO.

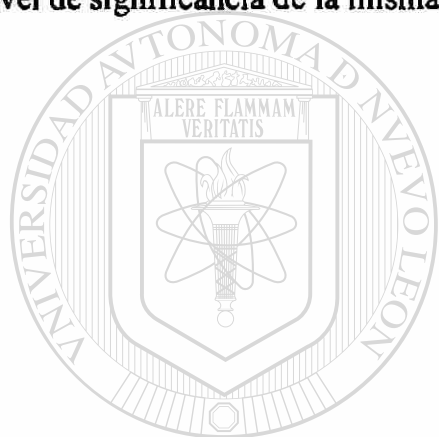
Los resultados obtenidos fueron evaluados empleando el programa STATGRAPHICS Plus 4.0 (Statistical Graphics Corp.) de la siguiente manera: Para evaluar si existían diferencias significativas en la concentración de VTG en plasma entre machos y hembras se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) para dos muestras, mientras que en el caso de la comparación a nivel de tratamientos en los biensayos 1 y 2, se empleó el análisis de rangos múltiples de Kruskal-Wallis (KW), debido al reducido número de observaciones por tratamiento (N=9).

Los resultados de calidad de huevos y larvas en el experimento # 1 fueron comparados empleando la prueba KS para dos muestras al ser rechazada la hipótesis de normalidad de los datos y en vista de haber obtenido solo los desoves de dos tratamientos, mientras que el crecimiento después de la larvicultura se analizó con la prueba *t* student. En cuanto a la tasa de fertilización, eclosión y supervivencia a la primera alimentación y después de la larvicultura se empleó análisis de proporciones mediante una tabla de contingencias (TC) para la distribución de chi-cuadrada.

Durante la evaluación del experimento #2, se observaron diferencias a nivel de los datos obtenidos de las diferentes hembras dentro de un mismo tratamiento, por lo cual se consideró evaluar el posible efecto del peso de la hembra sobre las variables en estudio mediante análisis de covarianza (ANCOVA). Este análisis arrojó resultados significativos (P= 0.00) de esta variable sobre el peso y diámetro de huevos mismo que fue confirmado con un análisis de regresión simple empleando como variable independiente el peso de la

hembra y como dependiente el peso y diámetro promedio de los huevos producidos por cada una ($n=100$). Considerando lo anterior, en el bioensayo #2, se decidió emplear como método básico de comparación, el análisis de covarianza (ANCOVA) para el caso de peso y diámetro de los huevos, talla y peso de larvas de primera alimentación y crecimiento en talla y peso transcurrida la larvicultura. En todos casos se empleó como covariable el peso de la hembra. En la comparación de la tasa de fertilización, eclosión y supervivencia de los tratamientos se empleó análisis de tablas de contingencia.

En todos los casos se consideraron diferencias significativas cuando los niveles de probabilidad fueron inferiores o iguales a 0.05 (Zar, 1984; Daniel, 1990). Asimismo, en cada uno de los resultados del análisis estadístico se señala el tipo de prueba empleada y nivel de significancia de la misma.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5. RESULTADOS.

5.1. RECLUTAMIENTO DE ORGANISMOS.

El reclutamiento de organismos en laboratorio permitió completar un lote de trabajo de 130 ejemplares de los cuales 90 organismos correspondieron a ejemplares adultos mayores y adultos jóvenes (3 años de edad crecidos en laboratorio) y 40 a ejemplares capturados entre 2000 y 2001, los cuales lograron adaptarse a las condiciones de manejo del laboratorio sin ningún problema de mortalidad.

5.2. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO.

5.2.1. Purificación de la Vitelogenina.

La revisión de las gónadas de los ejemplares tratados con 17β estradiol para el proceso inducción y de purificación de la proteína reveló que se trataba de machos. El análisis de los geles SDS-PAGE de las muestras de plasma de los individuos tratados y no tratados indica que los ejemplares inyectados con la emulsión hormonal conteniendo 17β estradiol presentan un patrón proteico diferente a los que recibieron la emulsión sin la hormona. Este patrón está caracterizado por la aparición de una banda de 177 KDa en los individuos tratados (Fig.1, carriles 3 y 5) y ausente en los no tratados (carriles 2 y 4). Esta misma banda proteica se mantuvo después del proceso de la precipitación selectiva de vitelogenina (carril 6) y de la filtración en Sepahrose 6B (carril 7) con lo cual se confirmó preliminarmente que se trataba de proteínas inducidas por el 17β Estradiol.

Asimismo, se observaron cambios en el contenido de proteína de las muestras de plasma de ejemplares, registrándose diferencias en la concentración de proteína total a la cuarta semana de 39.09 mg/ml en los organismos control y de 53.01 mg/ml para los ejemplares tratados. El proceso de precipitación fue eficiente para eliminar gran cantidad de proteínas plasmáticas, de manera que cuando este procedimiento se aplico al mismo volumen de plasma se recuperaron 0.54 mg/ml en individuos del grupo control y 35.59 mg/ml en los tratados.

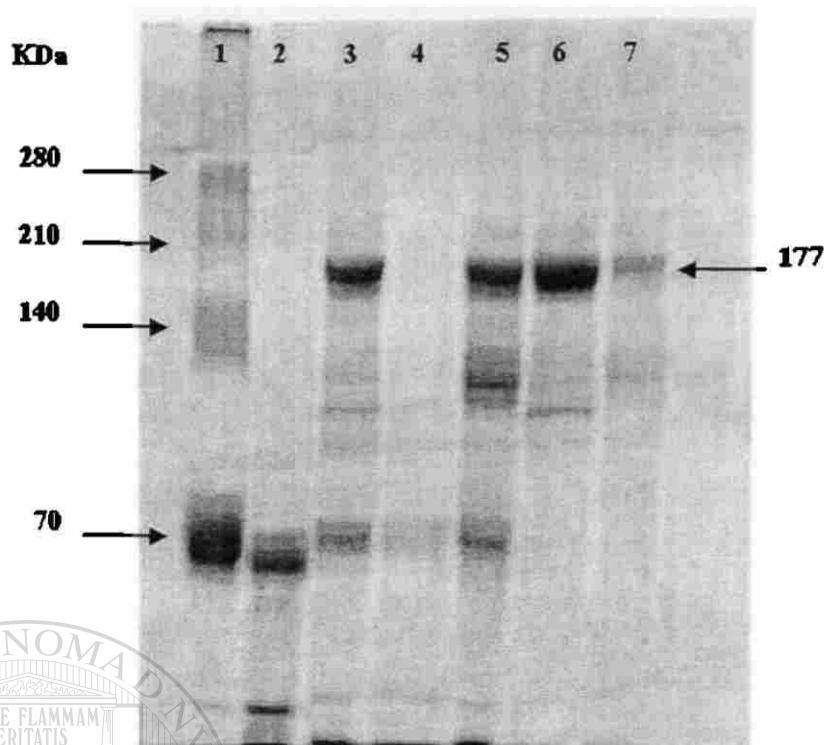


Figura 1. SDS-PAGE de plasma de ejemplares no tratados (2 y 4); tratados con estradiol (3 y 5), precipitado de VTG (6); fracción de Sepharosa 6B (7) y marcador de peso molecular Hemocianina (1).

— Empleando la precipitación selectiva, previa a la purificación por cromatografía, se obtuvo un número más reducido de fracciones proteicas provenientes de las muestras tratadas con 17β estradiol de acuerdo a la absorbancia a 280 nm registrada después de la filtración en Sepharosa 6B (Fig.2, a y b) e intercambio de iones en DEAE Sephacel (Fig. 4). De la misma forma cuando el procedimiento de precipitación se aplicó a plasma de organismos del grupo control, el contenido de proteínas del plasma disminuyó de manera significativa en las fracciones cromatográficas y no apareció ningún pico en los cromatogramas (Fig.3, a y b).

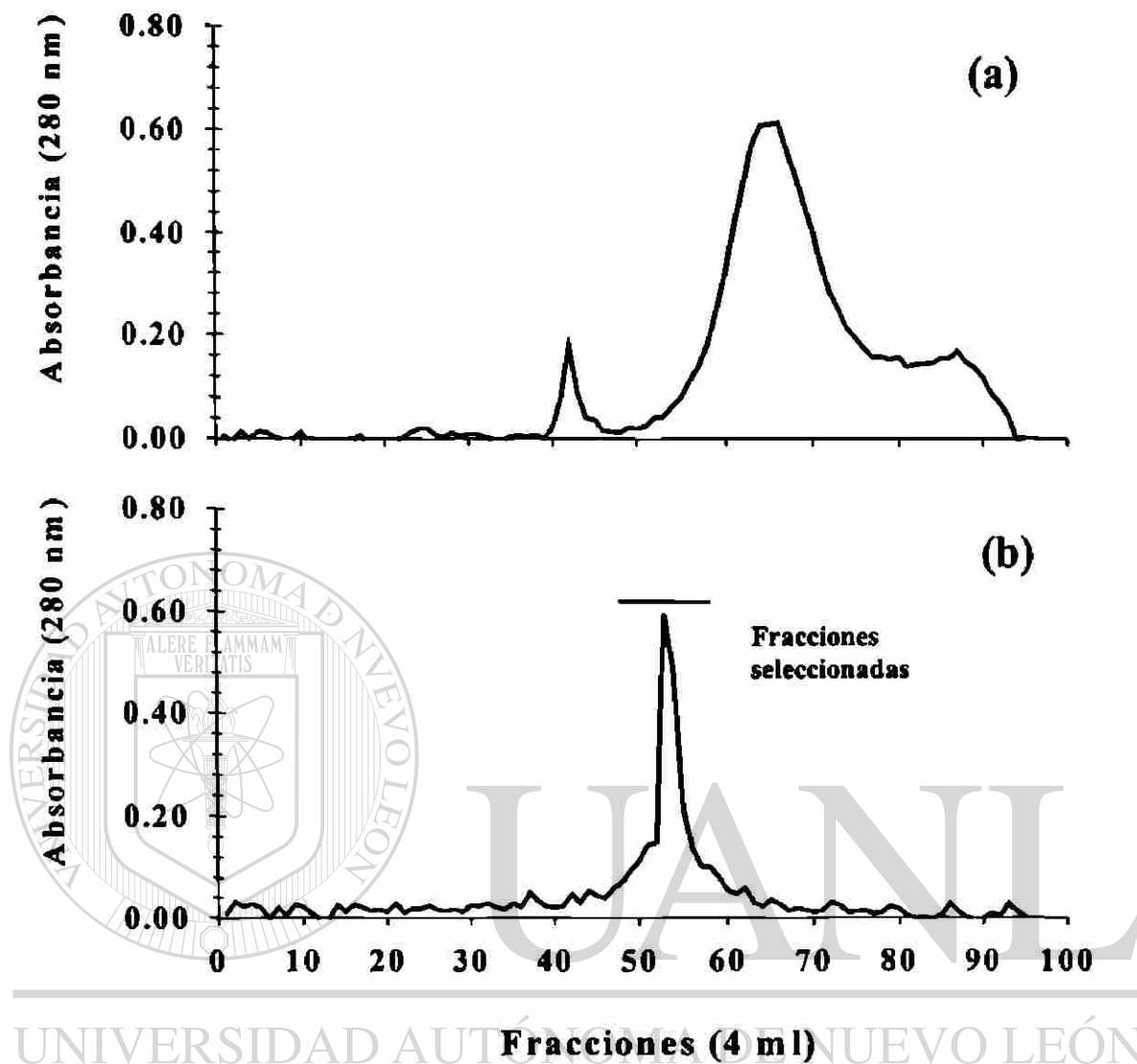


Figura 2. Perfil de las fracciones cromatográficas de filtración en gel de Sepharosa 6B de plasma de macho de *A. tropicus* tratados con 17 β Estradiol: sin precipitar (normal) (a); y precipitado con EDTA-MgCl (b) eluido con buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1% NaCl, 1 mM de MgCl, 1 mM PMSF.

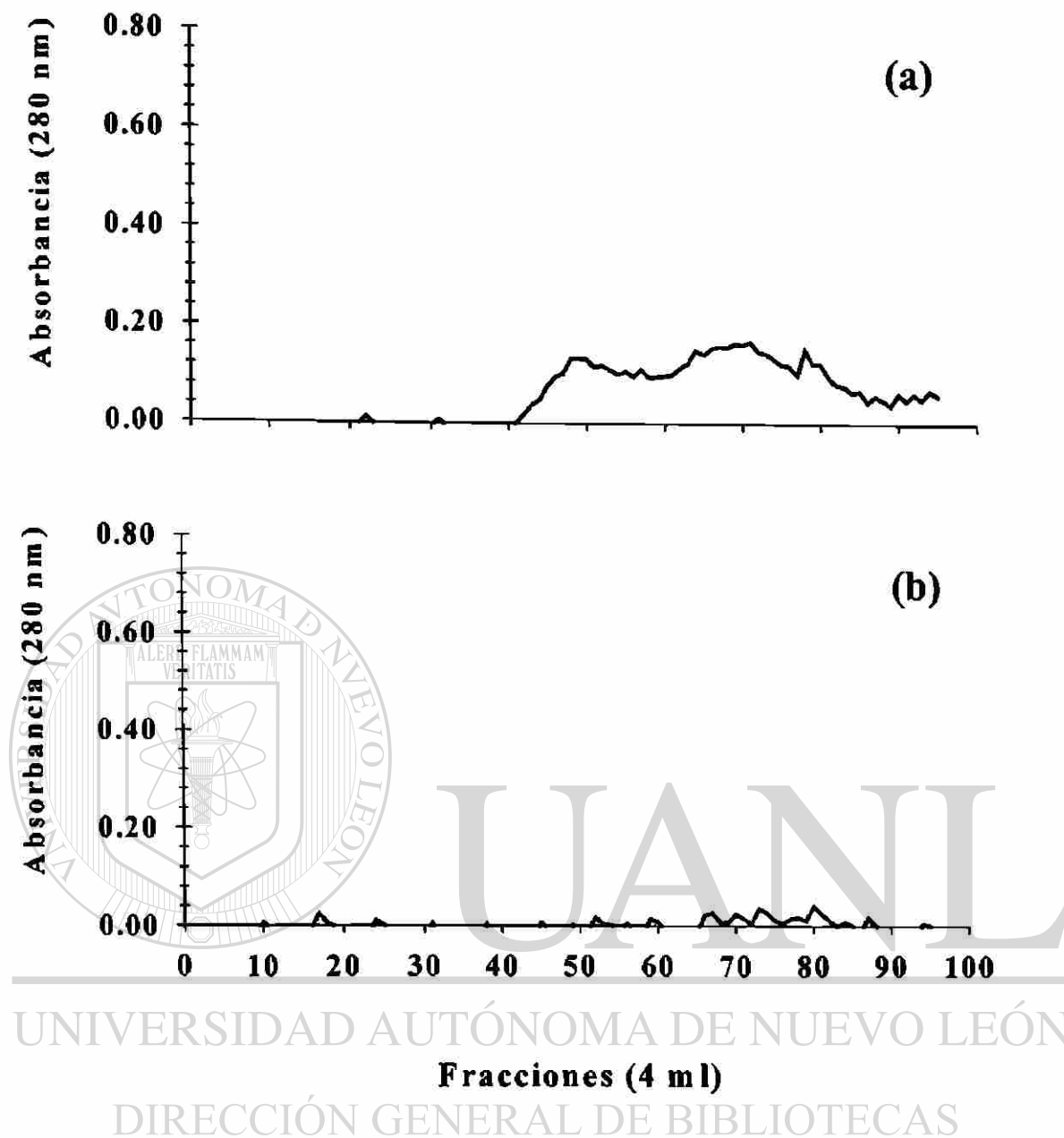
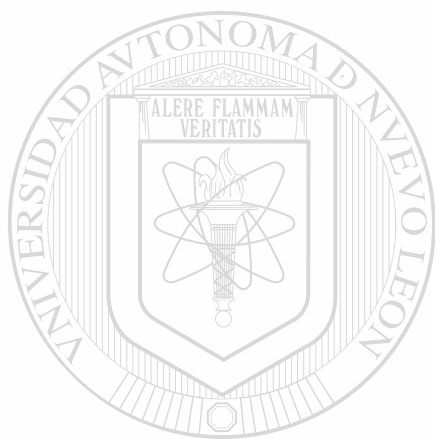


Figura 3. Perfil de las fracciones cromatográficas de filtración en gel de Sepharose 6B de plasma de macho de *A. tropicus* (Control): sin precipitar (normal) (a); y precipitado con EDTA-MgCl (b) eluido con buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1% NaCl, 1 mM de MgCl, 1 mM PMSF.

La VTG obtenida por el proceso de purificación mediante filtración en Sepharosa 6B se encontró entre las fracciones 50 a 54 y en DEAE Sephacel principalmente entre las fracciones 4 y 10. Adicionalmente el resultado de las electroforesis confirmó que durante los diferentes pasos de purificación la VTG; esta se conservó prácticamente sin degradarse y que las fracciones cromatográficas presentaban muy poca contaminación con otras proteínas plasmáticas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

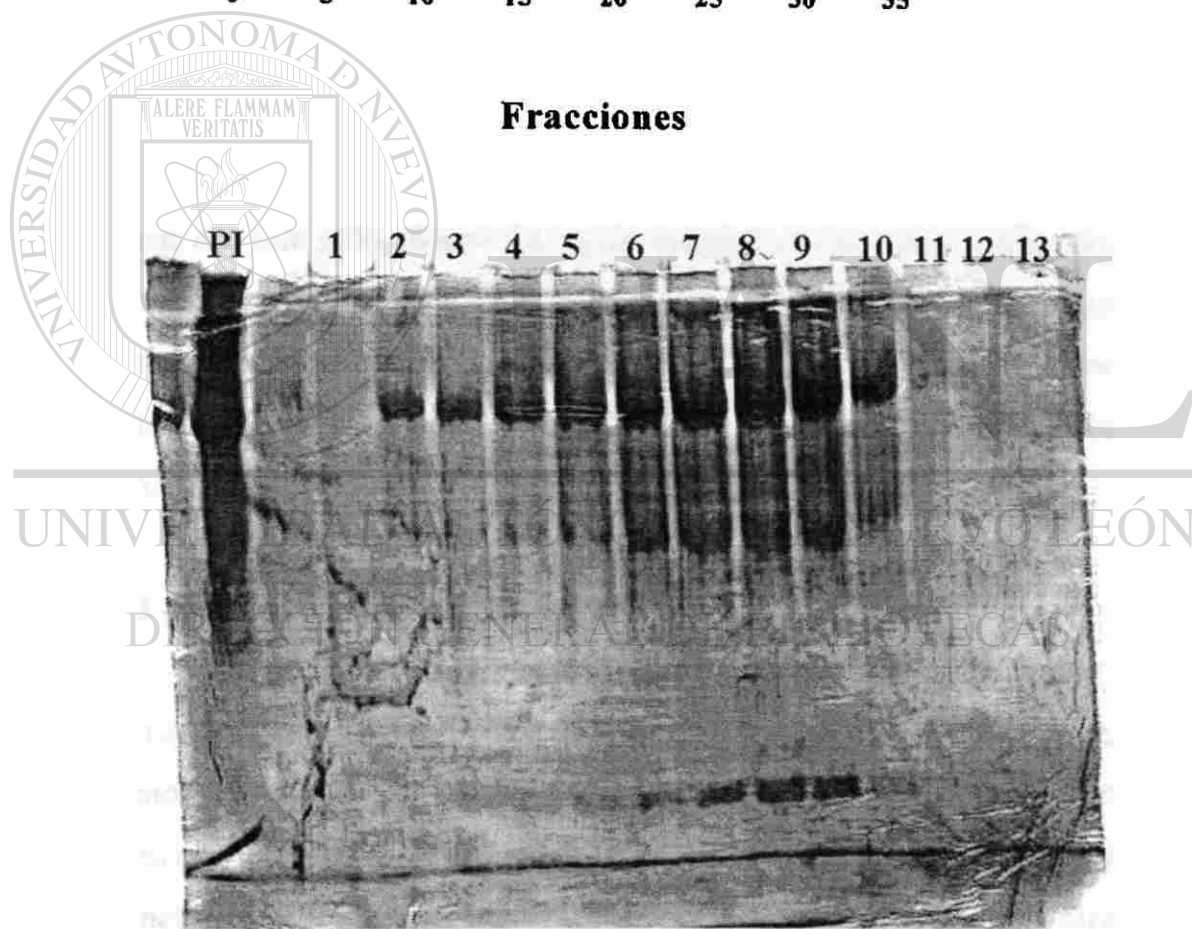
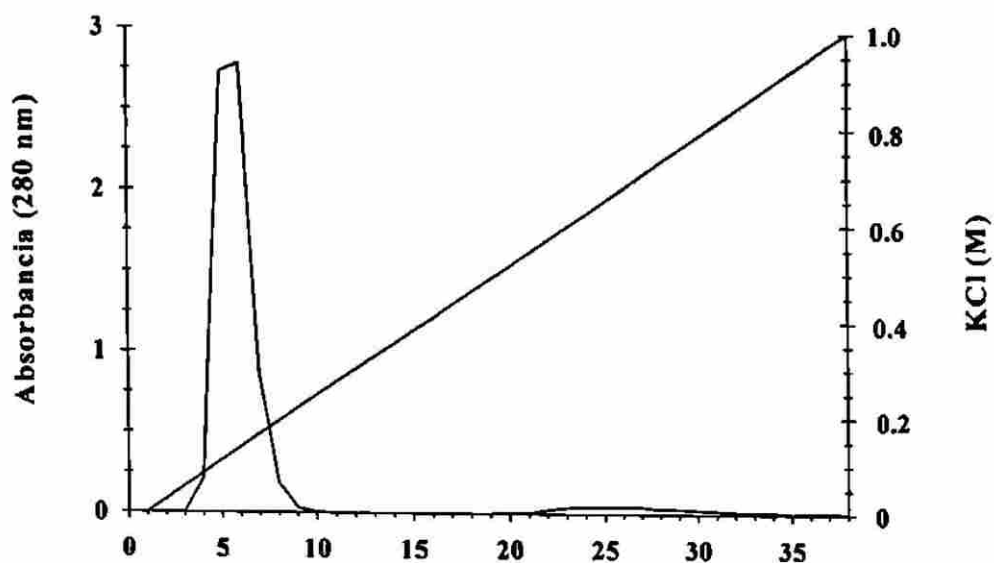


Figura 4. Perfil y SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de Intercambio Ionico en DEAE-Sephacel de plasma de macho de *A. tropicus*: tratado con 17β estradiol y precipitado con EDTA-MgCl eluido con buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1 mM PMSF en un gradiente de 0 a 1 M de KCl. PI: Precipitado Inyectado; 1-13: Fracciones de 4 ml.

Las fracciones cromatográficas de intercambio de iones se consideraron como las de mejor calidad debido a que en estas se observó el menor grado de contaminación por otras proteínas y la más baja degradación de la banda correspondiente a la VTG. LA VTG recuperada en el buffer de elusión fue liofilizada, lo que permitió recuperar un total de 5.6 μ g de VTG por cada mg de liofilizado.

5.2.2. Selección y Antigenicidad de Anticuerpos.

Las pruebas cruzadas preliminares empleando el anticuerpo y muestras de plasma de los ejemplares tratados y no tratados con estradiol indicaron que el anticuerpo reaccionó efectivamente contra aquellas que contenían el antígeno y de las cuales se aisló inicialmente (Fig. 5).

Los sueros de los tres conejos inmunizados reconocieron a la molécula de vitelogenina desde la segunda semana posterior a la inmunización, pero la actividad antigénica más alta solo se logró hasta la quinta semana. En este sentido como no se observaron cambios significativos en el título de anticuerpos a la octava semana, los conejos fueron sacrificados. En función del título antigénico observado de los tres ejemplares inmunizados, únicamente se empleó el antisuero del conejo que presentó el mayor título (1/16 en la quinta semana) para las pruebas subsecuentes .

5.2.3. Pruebas Cruzadas y Exámen Histológico .

Los resultados de las pruebas cruzadas implementadas para el sexado preliminar de los organismos provenientes de la reserva de la biosfera “Pantanos de Centla” fueron consecuentes respecto a la presencia de la VTG. Observándose una reacción antígeno-anticuerpo negativa en los machos, mientras que en las hembras fue positiva. Mediante este método, se detectó la presencia de VTG en 7 ejemplares correspondientes a hembras de acuerdo con la revisión de la gónada en campo, mientras que en los 5 ejemplares restantes no hubo reacción y la revisión gonádica indicó que se trataba de machos. El exámen histológico posterior de estos ejemplares indicó que se encontraban en un estadio de madurez avanzado (Fig 6 y 7)

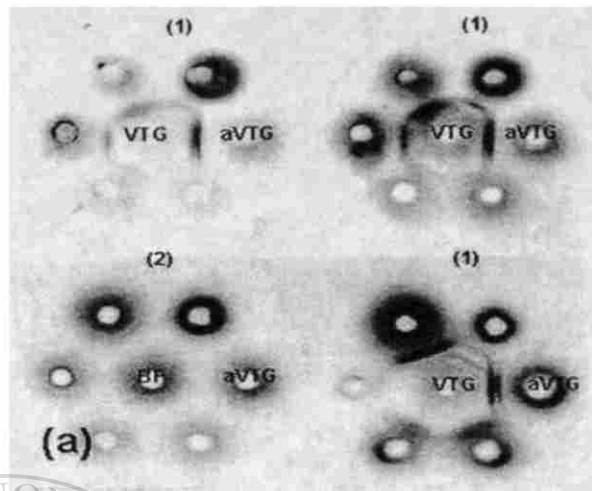


Figura 5. Pruebas cruzadas entre la VTG purificada y el suero anti-VTG obtenido en conejos, donde se muestran las líneas de precipitación de la reacción de reconocimiento del antígeno (1) y la ausencia de la misma en el testigo negativo(2). VTG: proteína purificada, anti-VTG: anticuerpo, BF: Buffer.

En el caso de los ejemplares mantenidos en cautiverio, la prueba efectuada en la segunda semana de mayo permitió establecer que de 120 ejemplares, el 48% (58) fueron positivos al suero anti-VTG mientras que el restante 52% (62) no presentaron reacción. Los resultados de la segunda prueba, realizada en el mes de junio fueron exactamente iguales a los obtenidos en mayo, con lo cual se inició la separación de los ejemplares y los preparativos del experimento # 1. Los geles resultantes indicaron que los ejemplares que presentaron la proteína, manifestaron una reacción de precipitación muy fuerte contra el anti-VTG, mientras que en los negativos no se observó ninguna (Fig. 8). La electroforesis de estas muestras de plasma confirmaron la presencia de la proteína en los individuos hembra, así mismo, el sacrificio de dos ejemplares macho y dos hembras permitieron constatar estos resultados.

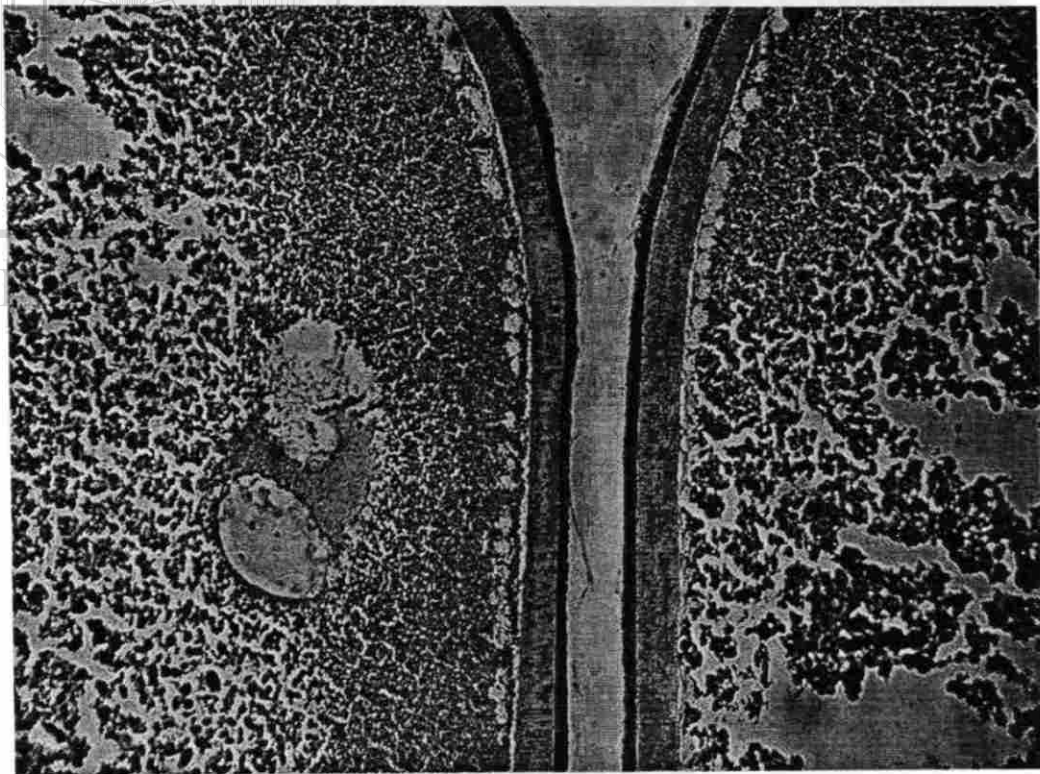
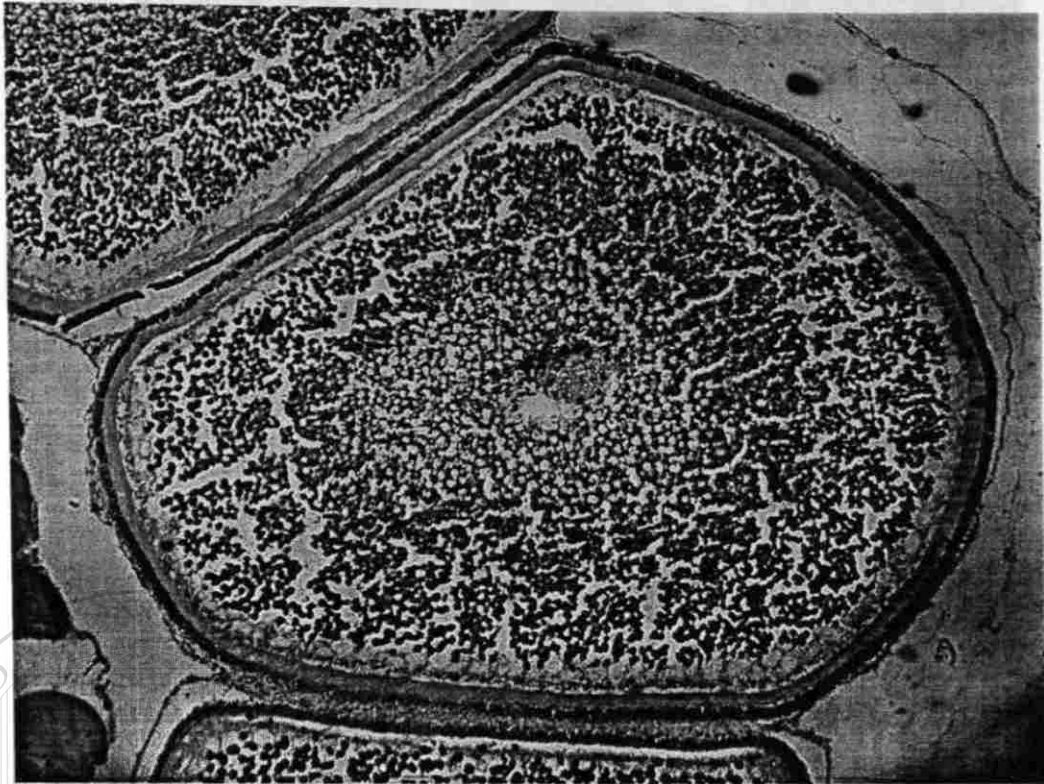


Figura 6. Ovocitos en estadios de vitelogénesis avanzada: con núcleo en posición central (a) y en fase de madurez final (FOM), con vesícula germinativa en posición periférica (b). Núcleo (n); ovoplasma (o); alvéolos corticales (ac); zona pelúcida (zp). H y E 100x.

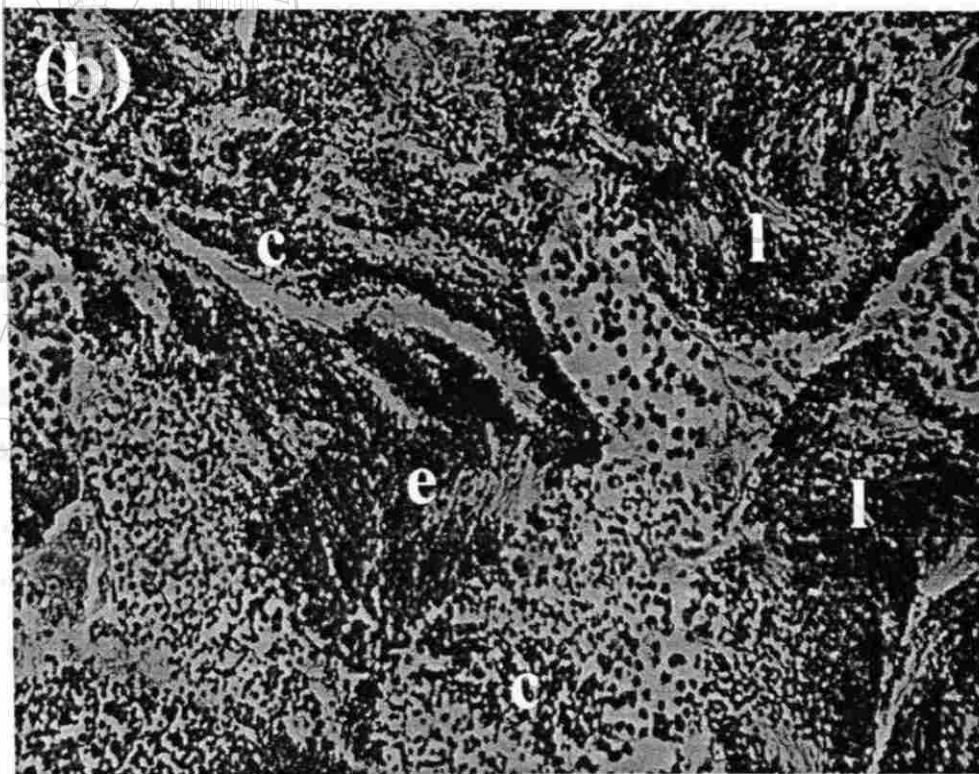
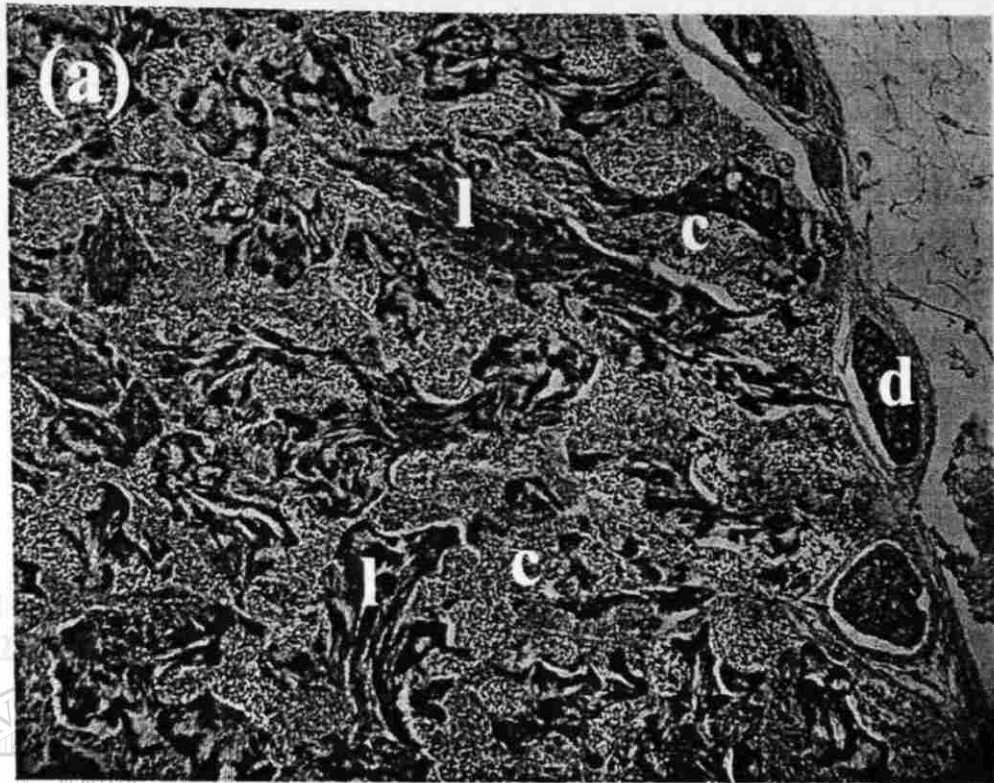


Figura 7. Corte del testículo en estadio V de espermatogénesis, Madurez Funcional. Lóbulos seminíferos llenos de espermatozoides H y E, 100x.(a). Detalle de los lóbulos seminíferos H y E, 400x.(b). Lóbulos con espermatozoides (I); espermatocitos con espermátidas en diferentes estadios de desarrollo (c); conductos deferentes con masas de espermatozoides (d); espermatozoides (e).

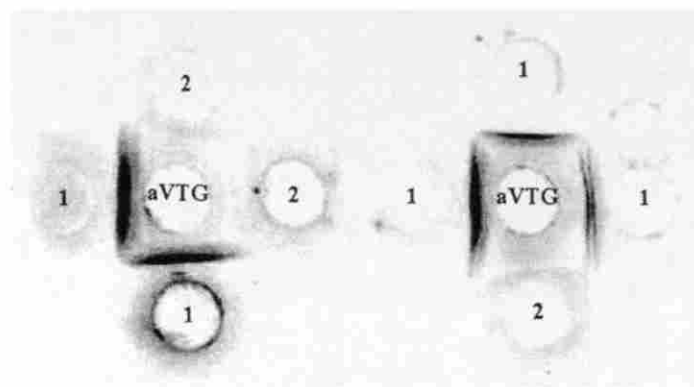


Figura 8. Reacción de precipitación de plasma de pejelagartos adultos; hembras (1) y machos (2) en presencia del suero anti-VTG.

5.2.4. Cuantificación de Vitelogenina Plasmática.

Identificación de "Hembras" (falsos-positivos).

La ausencia de desoves en algunos tratamientos en el experimento #1 al término del periodo de evaluación condujo al sacrificio de estos ejemplares. La revisión de las gónadas de estos organismos indicó que 6 de los 9 ejemplares catalogados como hembras en un inicio (positivos a la presencia de la VTG) realmente eran machos adultos maduros, listos para el desove de acuerdo con la revisión microscópica de muestras de esperma de los mismos. Al realizarse los primeros ensayos de cuantificación en función de los resultados obtenidos, se observó que estos ejemplares "hembras" falsos-positivos presentaban una concentración promedio de VTG de 0.86 ± 0.215 mg/ml, la cual era inferior ($KS P = 0.029$) a la de las hembras verdaderas con 3.22 ± 0.05 mg/ml al inicio del experimento (Fig. 9).

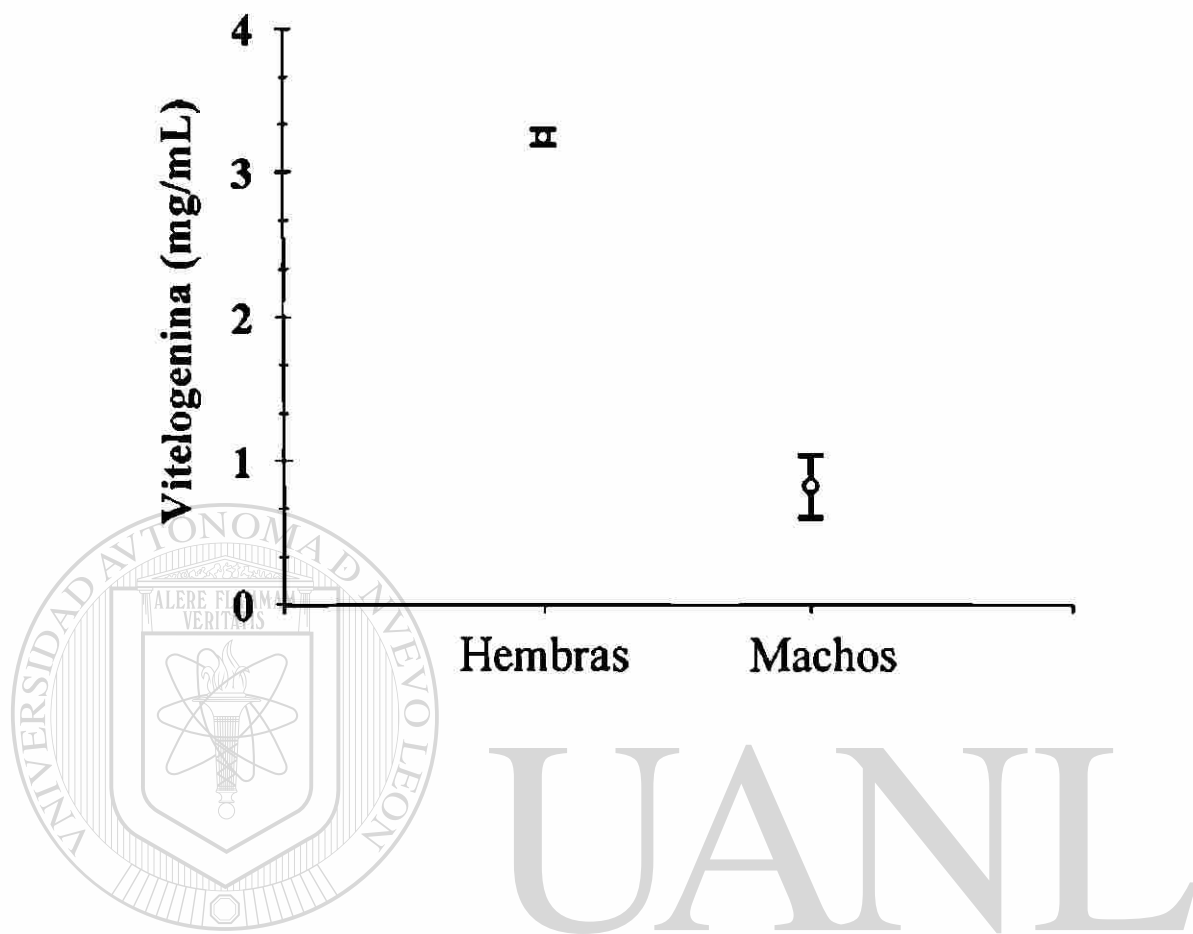


Figura 9. Concentración plasmática de VTG (Media \pm SD) de ejemplares hembras y machos ("hembras" Falsos-positivos) de pejelagarto al inicio del experimento # 1.

Identificación del Sexo.

El sexo de los ejemplares logró ser determinado con mayor éxito empleando la evaluación preliminar de los geles de cuantificación positivos para la VTG. De esta forma, aquellos que presentaron niveles inferiores a 1.3 mg/ml fueron catalogados como machos, mientras que los que presentaron valores superiores se consideraron hembras (Tabla 1).

Es necesario señalar que los ejemplares con valores superiores a 1.4 pero inferiores a 2.9 mg/ml se catalogaron arbitrariamente como posibles hembras en fase de vitelogénesis y aquellas superiores a 3.0 mg/ml como hembras maduras listas para el desove, en función de los resultados del experimento #1 (Fig. 10).

Tabla 1. Clasificación subjetiva del sexo de adultos de *A. tropicus* a partir del nivel de vitelogenina plasmática.

Nivel de VTG (mg/ml)	Categoría
Menor a 1.3	Machos
1.4 a 2.9	Hembras en Vitelogénesis
Mayor a 3.0	Hembras Maduras

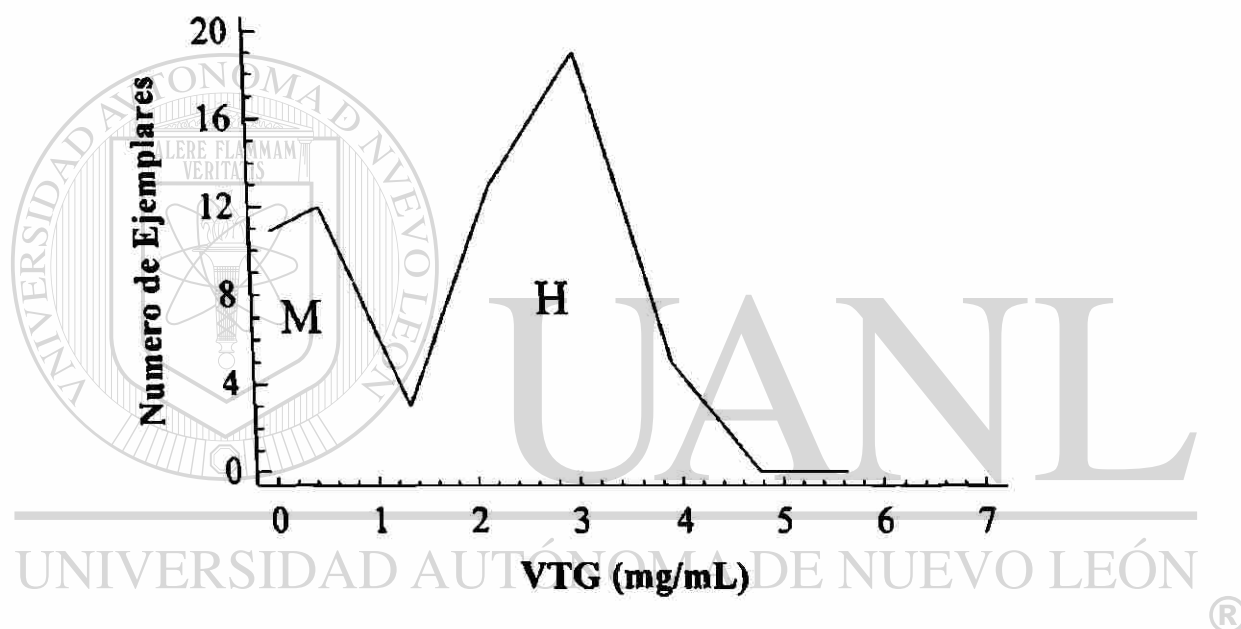


Figura 10. Concentración plasmática de VTG de ejemplares de laboratorio de *A. tropicus* en la segunda semana del mes de julio (empleadas en la clasificación de sexos). M: Machos; H: hembras.

La electroforesis de las muestras del plasma de los ejemplares machos que reaccionaron con el suero anti-VTG confirmó la presencia de la misma banda de proteína correspondiente a la de las hembras (Fig. 11).

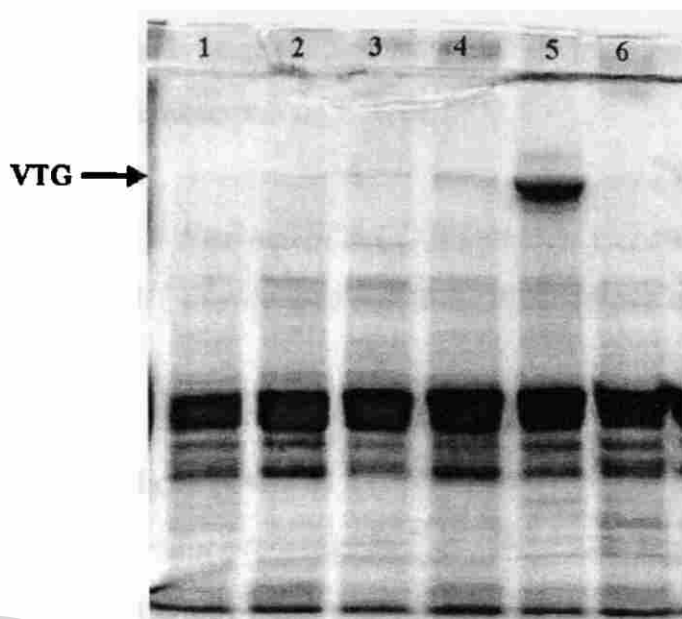


Figura 11. SDS-PAGE de plasma de ejemplares de *A. tropicus*: machos típicos (1 y 6); hembra típica (5) y machos con VTG (“hembras” falsos-positivos) (2,3,4).

Esta clasificación, posteriormente se consideró con cierto grado de subjetividad debido a que se obtuvo un desove en el mes de agosto de una hembra que en julio tenía un nivel de VTG de 1.26 mg/ml. De igual forma, se observó un macho participando en un desove en agosto cuando en julio tenía un nivel de VTG de 1.89 mg/ml. (Clasificado inicialmente como hembra en vitelogénesis).

Sin embargo, cabe hacer mención que los resultados relativos a los desoves programados a partir de esta clasificación resultaron exitosos en su mayoría empleando[®] Ovaprim[™]. Dicha programación consistió en inducir inicialmente hembras con niveles altos de VTG en julio y subsecuentemente, en meses posteriores aquellas, con niveles inferiores. Con lo anterior se demostró que el valor empleado para separar a los machos (≤ 1.3 mg/ml) fue efectivo, aún con las excepciones mencionadas.

5.3. INDUCCION AL DESOVE.

La revisión de las gónadas de los ejemplares sacrificados el 8 de julio del 2001 indicó que al inicio del experimento #1, las hembras se encontraban en un estadio avanzado de madurez gonádica, lo que vino a ser confirmado por el color verde olivo característico

de esta etapa de los huevos y un con un IGS de 0.153. En cuanto al los machos, la revisión microscópica de las muestras de semen indicó actividad de los espermatozoides, el testículo apareció con color blanco cremoso con un IGS de 0.07.

5.3.1. Experimento 1. Evaluación del 17β estradiol y el análogo superactivo des-Gly¹⁰- (D- Ala⁶) LHRH ethylamide para inducir el desove en ejemplares de pejelagarto.

El peso de los ejemplares positivos a la VTG utilizados en este bioensayo, fue de 1,373.0 a 3,716.0 gr. con un valor promedio de $2,495.26 \pm 289.22$ gr. No se observaron diferencias significativas entre los pesos promedio entre tratamientos (KW, $P= 0.84$) al inicio del experimento.

Considerando los resultados obtenidos sobre la aparición de los individuos “hembras” (falsos-positivos) en este experimento, solo se obtuvieron datos del desove de dos hembras, presentándose por lo tanto solo la información descriptiva de los mismos y las comparaciones con las réplicas obtenidas de estas hembras.

Respuesta a la Inducción.

El primer desove se presentó al siguiente día de iniciado el tratamiento en la hembra que fue inyectada con $35 \mu\text{g/Kg}$ Des-Gly¹⁰ LHRHe (3,081 gr), mientras que la hembra del grupo control solo desovó cuando fue inyectada con 0.2 ml/Kg de Ovaprim hasta el día 16 (3,634 gr.). Por otro lado, la hembra tratada con estradiol no presentó signos de conducta reproductiva, ni se observó la expulsión de huevos al oprimir al región abdominal. El tiempo para iniciar el desove después de la inyección fue de 12 horas para Des-Gly, mientras que para Ovaprim fue de 15 hrs, en el caso de esta última se observaron algunos efectos negativos asociados a la manipulación manifestados con una disminución del apetito.

Calidad de Huevos y Larvas

El diámetro promedio de los huevos (3.63 ± 0.02 mm) obtenidos de la hembra que recibió el tratamiento Des-Gly fue superior (KS, $P= 0.00$) con, respecto a aquellos de la

hembra inyectada con Ovaprim (3.42 ± 0.02 mm). Sin embargo, los de esta última presentaron mayor peso (KS, $P= 0.00$) con 33.2 ± 0.83 mg comparados con los de Des-Gly 27.2 ± 0.63 (Fig. 12 a y b).

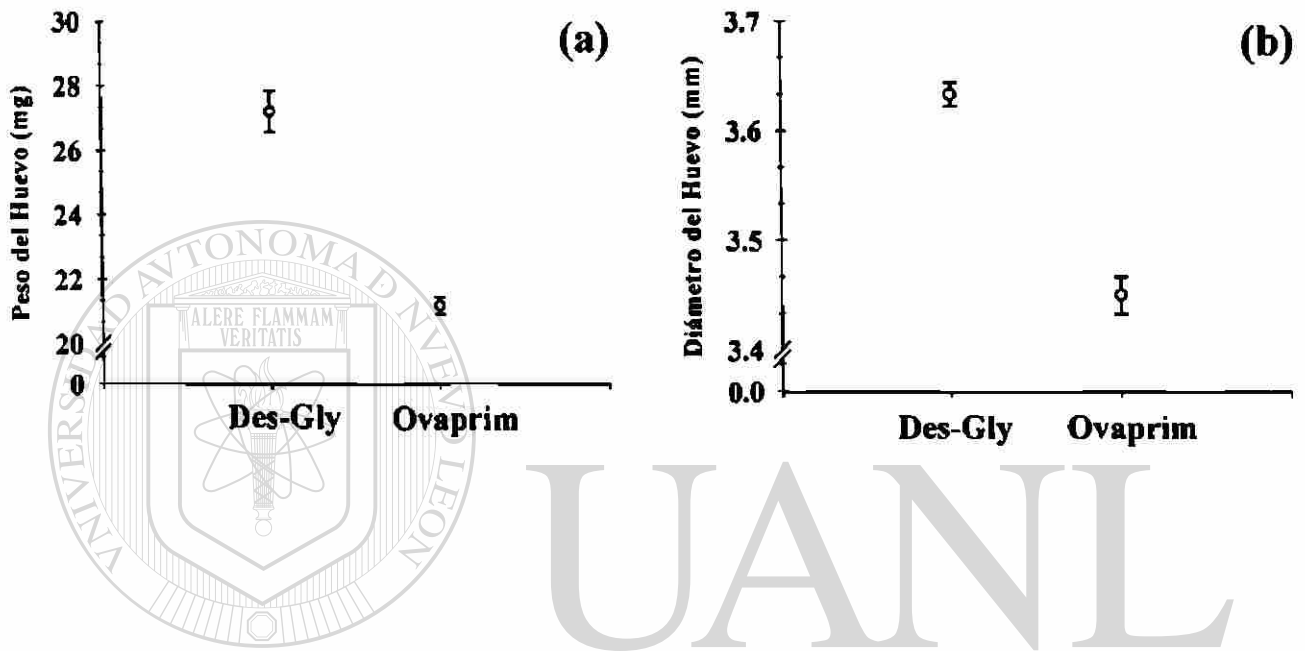


Figura 12. Biometría de huevos de *A. tropicus*: (a) peso y (b) diámetro de huevos obtenidos del experimento 1.

En cuanto a la tasa de fertilización, los huevos provenientes de la hembra inyectada con Des-Gly presentaron un valor superior con 97.5% (TC, $P= 0.005$) en comparación con los producidos por la hembra inyectada con Ovaprim con 83 % (Fig. 13a). No se observaron diferencias significativas (TC, $P=0.84$) en las tasas de eclosión entre los huevos obtenidos de la hembra inyectada con Des-Gly (94.4 %) y los de Ovaprim (93.30 %) (Fig 13b).

Las larvas recién eclosionadas obtenidas por la inducción con Ovaprim presentaron una mayor longitud (KS, $P= 0.00$) con 8.55 ± 0.09 mm respecto a las provenientes de la inducción con Des-Gly (8.32 ± 0.07 mm), pero con menos peso 11.3 ± 0.01 mg (KS, $P= 0.00$) respecto a Des-Gly con 12.2 ± 0.22 mg.

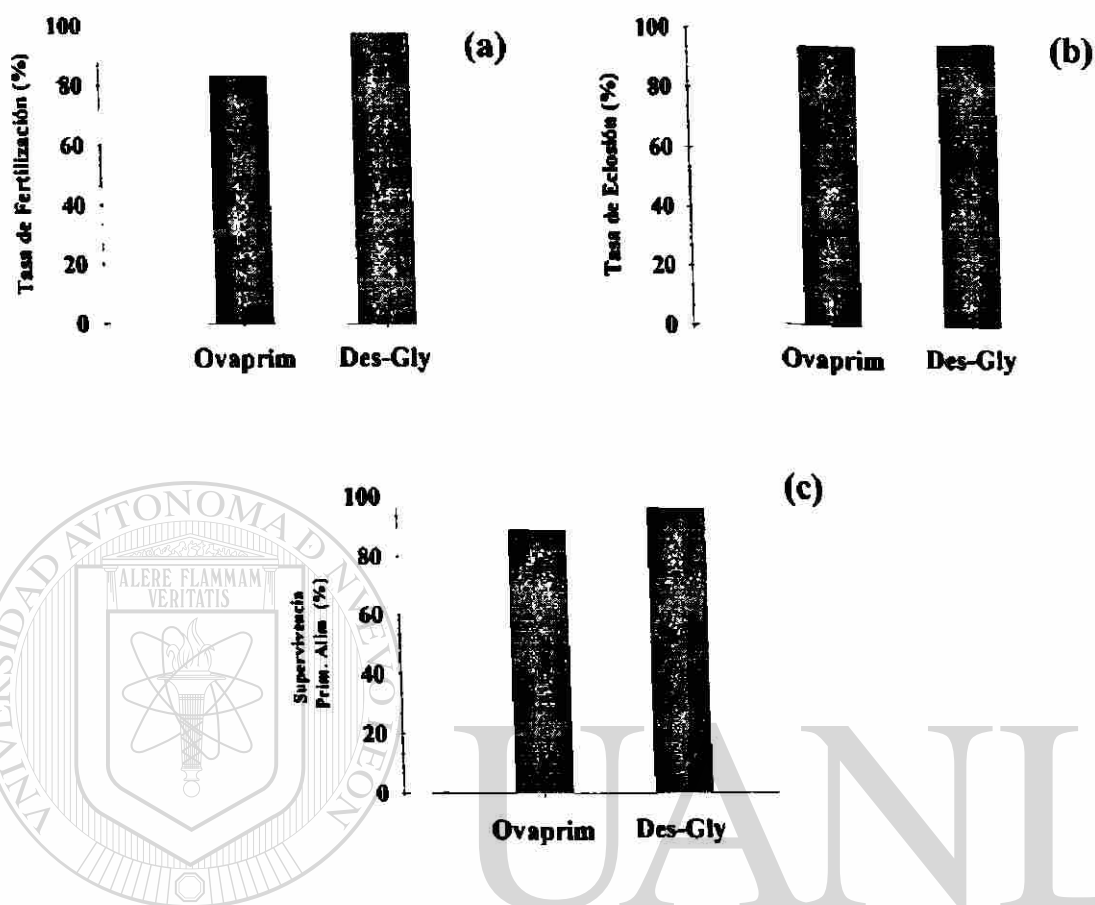


Figura 13. Tasas de Fertilización (a), Eclósión (b) y Supervivencia a la Primera Alimentación (c) de *A. tropicus* durante el experimento 1.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al inicio de la alimentación las larvas de Des-Gly resultaron superiores tanto en longitud (KS, $P= 0.01$) como en peso (KS, $P= 0.00$) con 19.09 ± 0.16 mm y 31.74 ± 0.47 mg, mientras que las de Ovaprim presentaron 18.84 ± 0.16 mm y 30.48 ± 0.21 mg respectivamente (Fig.14a y 14b).

Cultivo de Larvas.

Culminada la fase de cultivo larval, se observó que las larvas del tratamiento con Des-Gly fueron de talla y peso inferiores (38.15 ± 0.27 mm y 222.7 ± 0.43 mg) (Prueba t , $P= 0.00$) a las provenientes de Ovaprim (35.54 ± 0.42 mm y 157.74 ± 0.33 mg) (Fig. 14c y 14d). Sin embargo, un comportamiento opuesto se obtuvo en la supervivencia final, la cual

fue superior (TC, $P= 0.00$) en el caso de Des-Gly con $99.3 \pm 0.5 \%$ contra Ovaprim con $85.62 \pm 2.61 \%$ (Fig. 14e).

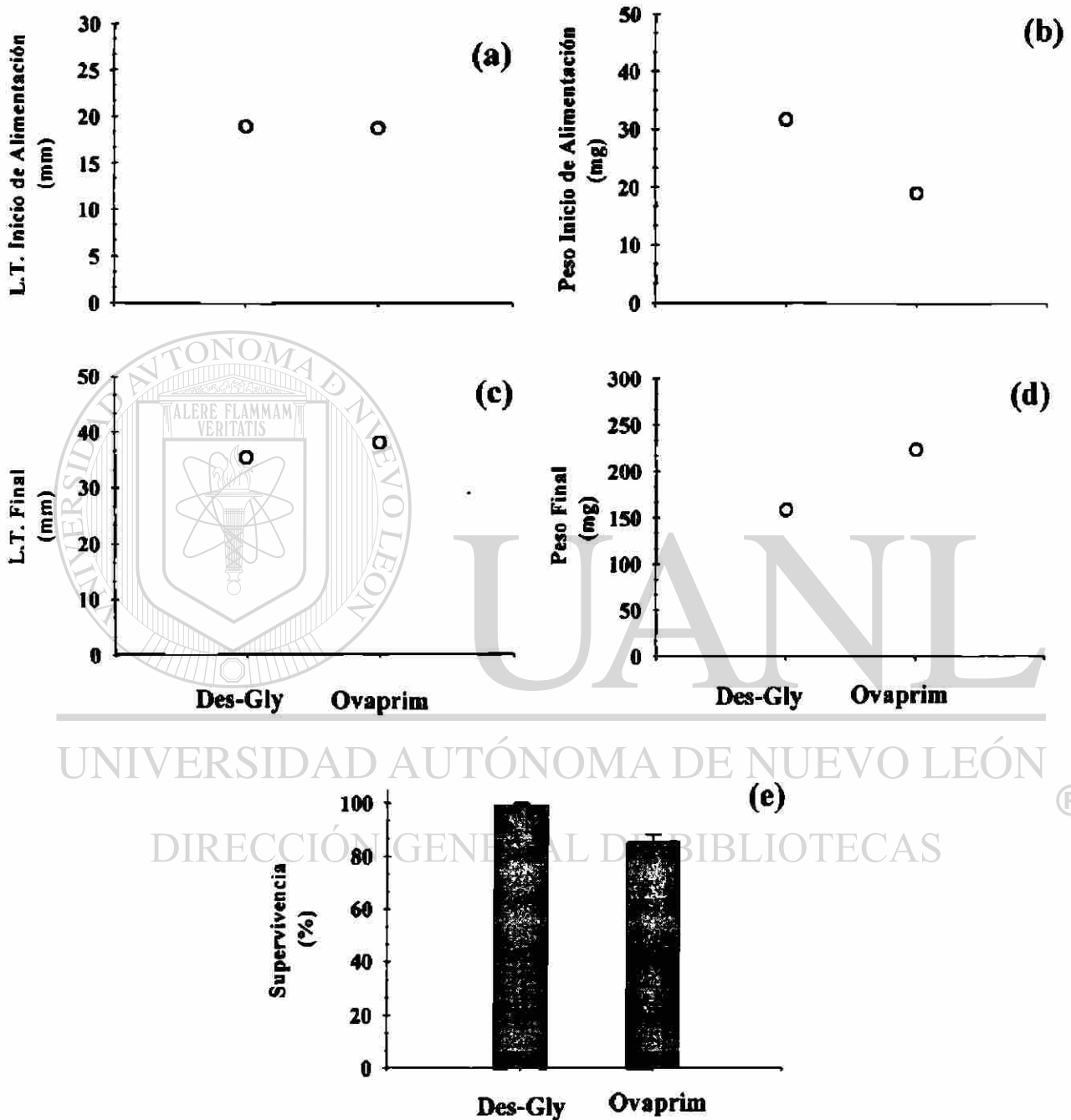


Figura 14. Longitud total y peso de larvas de pejelagarto de primera alimentación (a, b), al final de la larvicultura (c, d) y Supervivencia terminado el periodo de cultivo de 13 días (e).

5.3.2. Experimento 2. . Inducción al Desove de Pejelagarto mediante la inyección de los Análogos Superactivos des-Gly¹⁰ - (D- Ala⁶) LHRH ethylamide y D-Ala⁶ - LHRHa.

Los ejemplares empleados en este bioensayo presentaron un peso promedio de $1,072.2 \pm 3.87$ gr. para el caso de las hembras; mientras que en el caso de los machos, el peso promedio fue de 700.17 ± 18.93 gr. No se observaron diferencias significativas en el peso de las hembras de los diferentes tratamientos (KW, $P= 0.147$ CT= 833.0 ± 143.75 ; Des-Gly= 1262.77 ± 252.98 y D-Ala= 813.3 ± 11.92 gr.) (Fig. 15a) ni en la concentración de vitelogenina de los mismos (KW, $P= 0.587$, CT= 2.36 ± 0.18 ; Des-Gly= 2.51 ± 0.21 y D-Ala= 2.61 ± 0.18 mg/ml), (Fig. 15b).

Respuesta a la Inducción.

Los tratamientos se aplicaron por la tarde del 2 de Agosto del 2001 y los desoves iniciaron por la mañana, presentándose entre las 14 y 18 horas posteriores a la inyección. Los ejemplares que no desovaron correspondieron a una hembra del tratamiento con Des-Gly y una con D-Ala. Las observaciones de las gónadas después del sacrificio de estas hembras indicaron en el caso de Des-Gly huevos de color verde con un ligero tono café y muy frágiles al tacto; mientras que en el caso de la inyectada con D-Ala se observaron de apariencia normal. En el caso de las hembras inyectadas posteriormente y pertenecientes al grupo control, se obtuvo el desove de una de cada tratamiento aplicado (Des-Gly y D-Ala).

Calidad de Huevos y Larvas.

La evaluación inicial mediante el análisis de varianza de una vía indicó la existencia de diferencias ($P= 0.00$) entre los tratamientos para las variables de diámetro (D-Ala = 2.90 ± 0.03 ; Des-Gly 2.95 ± 0.04 mm) y peso de los huevos (D-Ala = 13.88 ± 0.18 ; Des-Gly = 15.21 ± 0.76 mg) (Figs. 15c y 15d respectivamente). Sin embargo, dicha diferencia queda eliminada cuando en el análisis se emplea como cofactor el peso de la hembra (ANCOVA, $P= 0.24$ y 0.20 respectivamente), observándose que en ambos casos esta variación se

explica por el efecto del peso de la hembra (ANCOVA, $P= 0.00$ y 0.02) que afecta significativamente el peso y diámetro de los huevos producidos ($r = 0.99$ y 0.85 ; $P= 0.00$ y 0.01 respectivamente) (Fig. 16 a y b).

La tasa de fertilización (D-Ala = 99.0 ± 1 ; Des-Gly = 96.7 ± 2.4 %) (Fig. 15e) y de eclosión (D-Ala = 84.15 ± 3.85 ; Des-Gly = 82.83 ± 2.89 %) fueron similares para ambos tratamientos (TC, $P= 0.17$ y 0.99 respectivamente) (Fig. 15f).

No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a talla de las larvas de primera alimentación (ANOVA/ANCOVA, $P= 0.134$) con 18.64 ± 0.09 y 18.42 ± 0.09 mm para D-Ala y Des-Gly respectivamente (Fig. 17a). Por otro lado, en cuanto al peso de las mismas (D-Ala 26.90 ± 0.16 mg; Des-Gly 27.62 ± 0.13 ; Fig. 17b), se muestran diferencias (ANOVA, $P= 0.001$), mismas que se eliminan cuando se emplea como cofactor el peso de la hembra (ANCOVA, $P= 0.68$).

Transcurrida la larvicultura se observó que no existía diferencias en cuanto a la longitud (D-Ala = 35.11 ± 0.20 ; Des-Gly = 35.16 ± 0.24 mm; Fig. 17c) y peso (D-Ala = 168.10 ± 2.41 ; Des-Gly = 161.08 ± 2.54 mg; Fig. 17d) de las larvas de ambos tratamientos (ANCOVA, $P= 0.20$ y 0.40 respectivamente), ni en la supervivencia (TC $P= 0.503$), que fue de 96.07 ± 0.92 y 93.59 ± 1.57 % respectivamente para D-Ala y Des-Gly (Fig. 17e).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

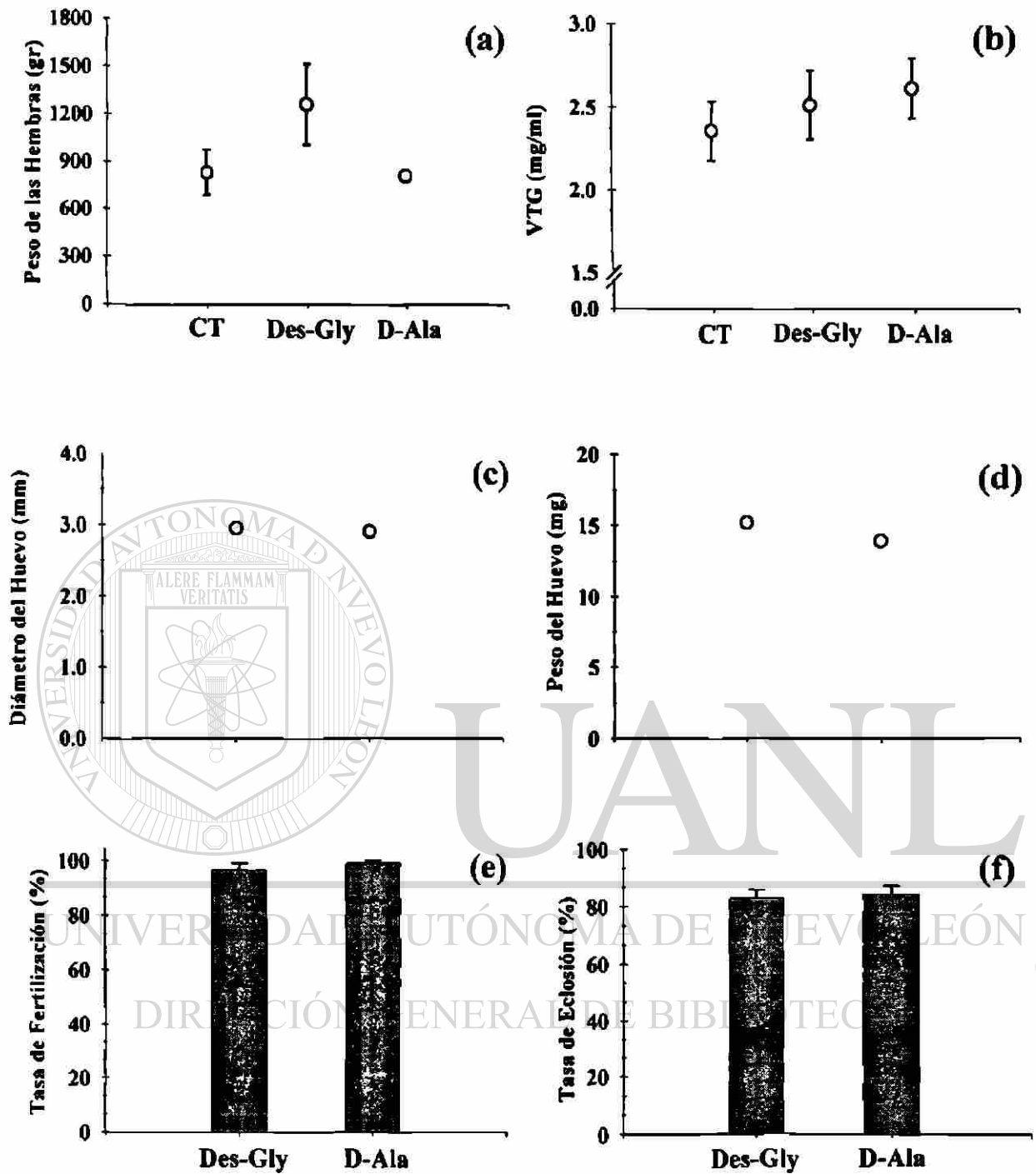


Figura 15. Peso promedio (a) y concentración de VTG (b) de hembras de pejelagarto empleadas en el experimento # 2; diámetro y peso de huevos (c y d) y tasas de fertilización (e) y eclosión (f) de los mismos (CT: Control; Des-Gly y D-Ala = 35 $\mu\text{g/Kg}$)

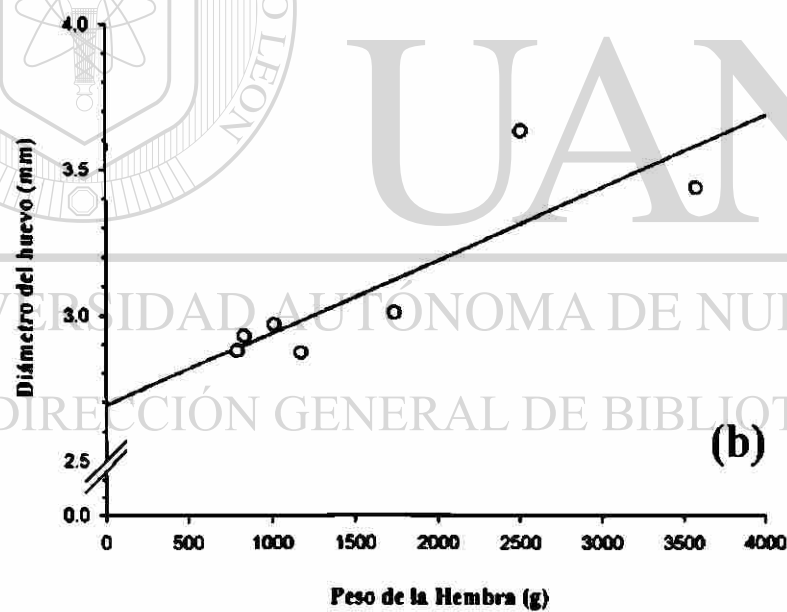
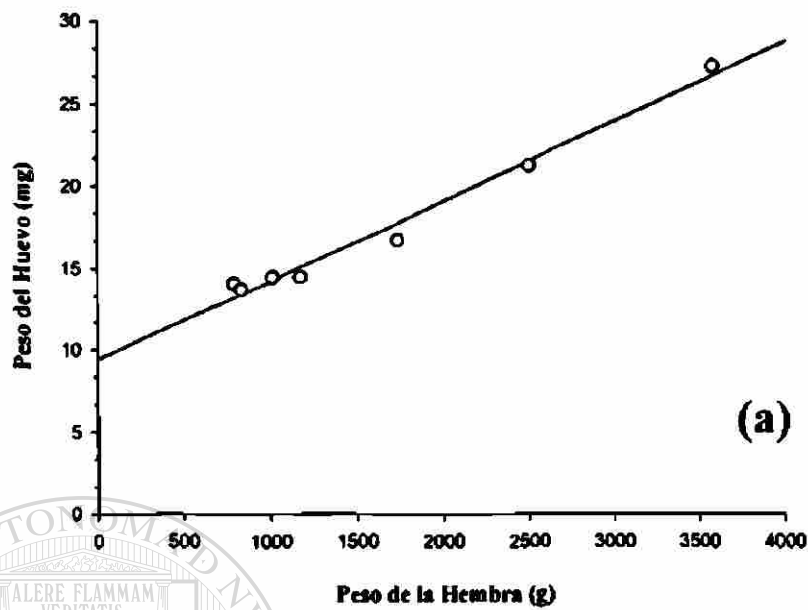


Figura 16. Regresión lineal simple entre el peso de las hembras y los pesos promedio de los huevos (a) ($r = 0.99$, $P = 0.00$); y peso de las hembras y diámetros promedio de los huevos producidos (b) ($r = 0.85$, $P = 0.01$).

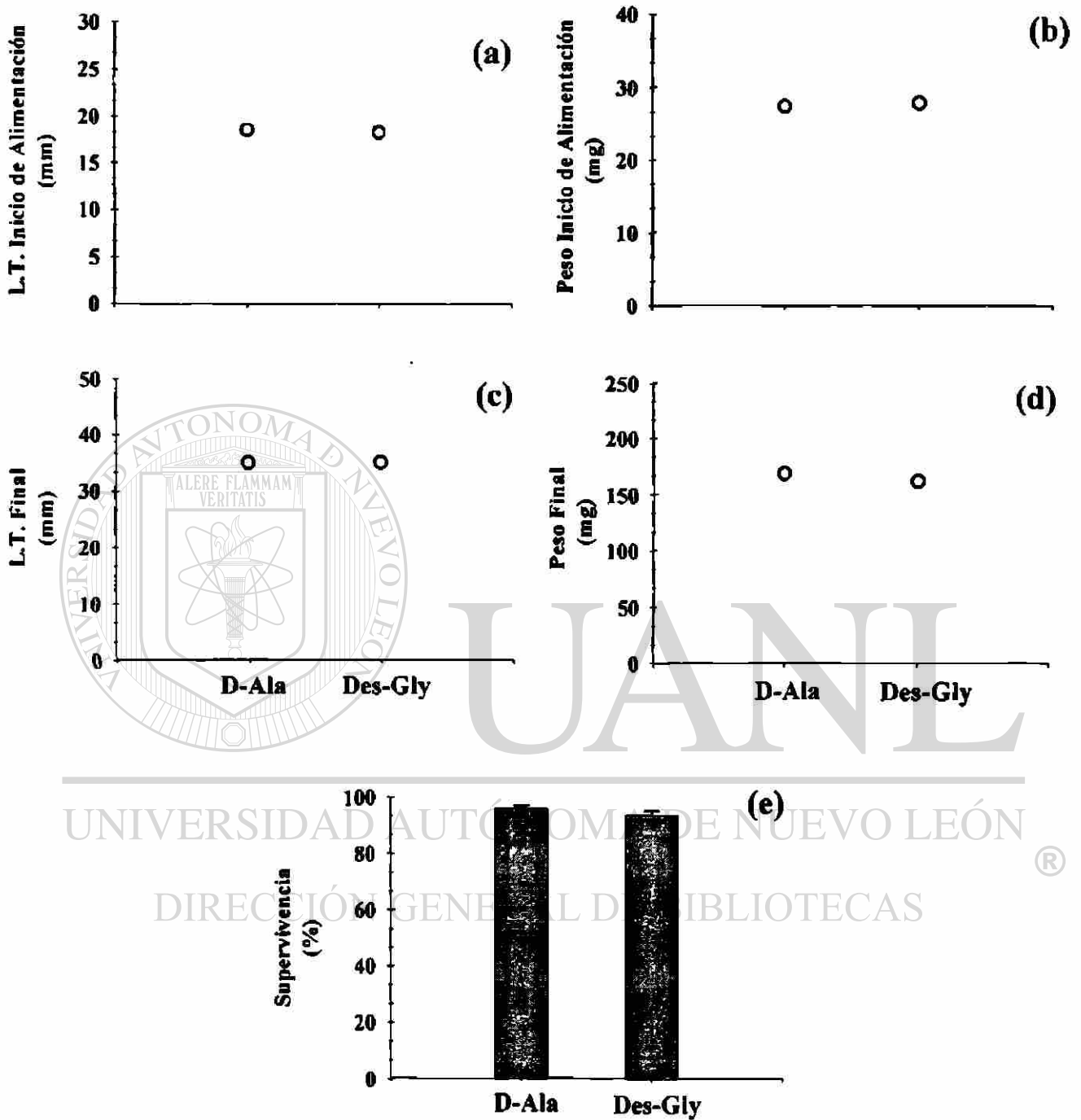


Figura 17. Longitud total y peso de larvas de pejelagarto de primera alimentación (a, b), al final de la larvicultura (c, d) y Supervivencia terminado el periodo de cultivo de 13 días (e), en el experimento #2

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que es posible identificar el sexo de ejemplares de pejelagarto, mediante una reacción inmunológica entre la VTG plasmática de *A. tropicus* y el suero anti-VTG producido a partir de la proteína purificada. Las pruebas cruzadas iniciales de los ejemplares de colecta silvestre y cultivados en laboratorio fueron consistentes con la observación directa y análisis histológico de las gónadas después de ser sacrificados. Aquellos que presentaron testículos produjeron reacción negativa y aquellos con ovarios fueron positivos hacia el anticuerpo obtenido para la VTG. Estas observaciones concuerdan con los reportes en *Oryzias latipes* (Hamazaki *et al.*, 1987); *Oreochromis niloticus* (Chan *et al.*, 1991); *Diodon holocanthus* (Fujita *et al.*, 1998); *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1994); *Macrozoarces americanus*, *Cyclopterus lumpus*, *Gadus marhua* (Yao y Crim, 1996); *Mycteroperca microlepis*, *Ephinephelus striatus* y *E. Guttatus* (Heppell y Sullivan, 1999). En estas especies la VTG es producida por las hembras durante la vitelogénesis estando ausente en los machos.

Las pruebas de electroforesis y cromatografía indican que los machos de *A. tropicus* tienen la capacidad de sintetizar una proteína inducida por la administración de 17 β estradiol, la cual responde inmológicamente con el suero anti-VTG, indicando la posible presencia de VTG. Esta proteína fue inducida y aislada del plasma de machos tratados con el esteroide como se ha realizado en otros teleosteos donde se ha observado que dicho estrógeno actúa sobre los hepatocitos desencadenando la síntesis de VTG (Khoo, 1979; de Vlaming *et al.*, 1980; Ng e Idler, 1983; Chan *et al.*, 1991; Matsubara y Sawano, 1995).

El hecho de que la inducción mediante estradiol en los machos de *A. tropicus* haya provocado la síntesis de VTG puede ser demostrada de diversas maneras. El suministro de estradiol a ejemplares machos de *A. tropicus* provocó un incremento de un 36% en el contenido total de proteínas del plasma comparado con el grupo de ejemplares

control. Un efecto similar se ha observado en machos de *Salmo gairdneri* (Flett y Leatherland, 1989) y *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994), donde se ha demostrado que la síntesis de VTG inducida por inyecciones de estradiol provoca el aumento del contenido total de proteínas del plasma de los ejemplares. Una gran proporción de estas proteínas de los machos de *A. tropicus* tratados fueron precipitables, por ser ricas en fósforo. En contraste, esto no fue observado en el plasma de los ejemplares control, siendo consistente con lo mencionado por Wiley *et al.*, (1979); de Vlaming *et al.*, (1980); Komatsu *et al.*, (1996) quienes indican que debido al alto contenido de fósforo de la VTG, es posible separarla de las proteínas plasmáticas por precipitación con EDTA-MgCl₂.

La SDS-PAGE de plasma de pejelagartos machos inyectados con estradiol presenta una banda proteica distintiva correspondiente a 177 kDa que no se observa en los ejemplares que no lo recibieron. Esta banda corresponde a una posición relativa idéntica a la producida en el plasma de hembras de *A. tropicus* en estadios de madurez gonádica avanzados, lo cual coadyuva a garantizar que la proteína inducida por el esteroide suministrado es la VTG. Esto coincide con las observaciones de otros autores quienes señalan que al ser inducida la VTG en machos inyectados con estradiol, presenta un peso molecular equivalente al de la VTG que se produce en las hembras de forma natural mediante el proceso de maduración de gonádica (Waagboe y Sandnes, 1988; Carnevali y Belvedere, 1991; Mañanós *et al.*, 1994a, Matsubara *et al.*, 1994; Takemura y Teruya, 1997). El peso molecular de la VTG de pejelagarto calculado mediante SDS-PAGE es cercano al peso de la proteína mayoritaria inducida por estradiol identificada como vitelogenina en otras especies y calculado mediante esta misma técnica. En *Plectropomus leopardus* se ha identificado con 180 kDa (Takemura y Teruya, 1997); igualmente en *Dicentrarchus labrax* de 180 kDa (Mañanós *et al.*, 1994b); en *Verasper moseri* entre 160 -180 kDa (Matsubara *et al.*, 1999); mientras que en *Mycteroperca microlepis* de 183 kDa (Heppell y Sullivan, 1999). En estos estudios también se señala que el peso molecular generalmente es mucho mayor al obtenido debido a que el SDS-PAGE provoca la disociación de la VTG en subunidades de menor peso molecular (Chan *et al.*, 1991).

Las mismas características del SDS-PAGE de la proteína inducida por estradiol en machos de pejelagarto se presentan en el plasma de las hembras al inicio y durante la temporada de desove natural, lo cual coincide con los resultados observados en *Carassius auratus* (de Vlaming *et al.*, 1980), *Salmo trutta fario* y *S. salar* (Bail y Breton, 1981), *Acipenser transmontanus* (Linares-Casenave, 1993) y en *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1995) donde la detección de VTG en plasma coincide con el proceso de vitelogénesis que permite la acumulación de reservas en los ovocitos.

El plasma de ejemplares machos inyectados con estradiol y hembras maduras presenta una fuerte reacción antigénica en presencia del suero con anti-VTG, de la misma forma que los extractos de huevo de pejelagarto (Datos no mostrados). Esto indica que los anticuerpos producidos reconocen un producto o productos equivalentes de la VTG del plasma que se acumula en los ovocitos en desarrollo. Una respuesta similar ha sido observada en la sardina japonesa *Sardinops melanostictus*, donde los anticuerpos obtenidos a partir de la VTG purificada de ejemplares macho inyectados con estradiol producen reacción antigénica en presencia del plasma de los ejemplares inyectados con estradiol, de hembras maduras y homogenizados de huevo, siendo negativa cuando se emplea plasma de hembras inmaduras y de machos control (Matsubara *et al.*, 1994). Esto indica que la proteína inducida por el estradiol y aislada del plasma en *A. tropicus* presenta propiedades antigénicas similares a la proteína mayoritaria de los ovocitos, siendo por lo tanto esta última un derivado de la VTG plasmática. Esto ha sido reportado igualmente en el caso de *Oncorhynchus mykiss* (Tyler, 1993); *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1994); *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994b); *Plectropomus leopardus* (Takemura y Teruya, 1997) y *Verasper moseri* (Matsubara y Koya, 1997).

Para la identificación de los sexos de aquellas especies que no presentan dimorfismo sexual se han propuesto varios métodos. Algunos de éstos métodos están relacionados con la extracción de muestras de gametos, lo que también permite obtener información sobre el estado de madurez gonadal (Alvarez-Lajonchere *et al.*, 2001). Para la extracción de gametos generalmente se emplea canulación, punción ovárica o cirugía

(Rodríguez, 1992; Lajonchere *et al.*, 2001). Estas técnicas pueden ser muy efectivas para la evaluación dependiendo de las condiciones anatómicas de cada especie. Sin embargo, también pueden ser traumáticas para el organismo, provocando estrés que se puede manifestar con consecuencias desfavorables en el desempeño reproductivo y la producción de gametos (Contreras *et al.*, 1998; Schreck *et al.*, 2001) o ser una vía posible de infecciones y enfermedades (Tucker, 1994). Debido a la dificultad de identificación del sexo en los lepisosteidos se han propuesto métodos como el reportado por Ferrara e Irwin (2001) basado en la revisión del número de conductos gonádicos; sin embargo, este procedimiento requiere el sacrificio de los ejemplares.

El único método ensayado hasta el momento en pejelagarto ha sido la canulación, sin embargo no se han logrado obtener muestras de gametos femeninos con facilidad debido a que existe un estrechamiento del oviducto que dificulta el paso de la cánula y provoca daños en este tejido, habiendo acceso aparentemente solo al momento de la ovulación (Páramo, com. pers. 2001), condición conocida como condrictina o gimnoaria (Rodríguez, 1992), que se ha documentado en peces del género *Epinephelus* (Tucker 1994). Esta situación ha impedido realizar una evaluación adecuada previa a esta etapa y en consecuencia la dificultad de la identificación del sexo en pejelagartos.

La VTG detectada en plasma de hembras en laboratorio al inicio de la temporada de desove mediante el anticuerpo, fue evidenciada por el SDS-PAGE de las mismas. Este método para identificar el sexo, está relacionado con la evaluación de uno de los componentes distintivos del plasma que incrementan su concentración o aparecen en circulación en las hembras de peces durante la temporada reproductiva y que generalmente están correlacionados con el estado de madurez de la gónada. Para el análisis de dichos componentes no se requiere emplear los métodos invasivos que se han descrito con anterioridad lo cual puede ser menos traumático para *A. tropicus*. Dentro de estos componentes se pueden mencionar además de la concentración de VTG (Le Bail y Breton, 1981; Mañanós *et al.*, 1994a; Matsubara *et al.*, 1994, 1995; Takemura y Oka, 1998; Fujita *et al.*, 1998; Heppell y Sullivan, 1999); la de esteroides (Chiba *et al.*, 1994; Matsubara *et al.*, 1995; Taranger *et al.*, 1998); Calcio (Nagler *et al.*, 1987; Linares-

Casenave, 1990; Doroshov, *et al.*, 1997; Björnsson *et al.*, 1998); Fósforo ligado a proteínas álcali-lábiles o ALPP (Craik y Hervey, 1984; Nagler *et al.*, 1987); Proteínas específicas del suero de hembras o FSSPs (Takemura *et al.*, 1991; Fujita *et al.*, 1998) o proteínas del moco (Chang *et al.*, 1996).

La aparición de los ejemplares falsos-positivos (machos con reacción del plasma en presencia de anti-VTG) condujo a la revisión y repetición de las pruebas cruzadas. Sin embargo, la revisión de las gónadas constató la presencia de testículos en algunos ejemplares que reaccionaron positivamente al suero anti-VTG. La presencia de falsos positivos resultó inusual debido a que fueron pocos ejemplares los que presentaron esta condición comparados con el número de machos que respondieron como negativos a la prueba. Las posibles causas de este resultado pueden abordarse desde varios puntos de vista. Una primera opción es que los anticuerpos obtenidos reconozcan alguna proteína plasmática que no haya sido completamente separada durante el proceso de purificación. De ser el caso de nuestro muestreo, se esperaría que todos los ejemplares resultaran falsos positivos. También es posible que la proteína inducida con estradiol en machos no sea VTG; sin embargo, los argumentos previos apoyan el planteamiento de que efectivamente corresponde a VTG. Otras proteínas que son inducidas por la administración de estradiol son la proteína de la envoltura vitelina (VEP) y la proteína de la zona radiada (PEII). Estas proteínas de forma normal no se encuentran presentes en machos y aparecen durante la maduración gonádica de las hembras junto con la VTG (Matsubara *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2000).

En otro contexto, los ejemplares machos detectados como falsos-positivos pudieron estar bajo la influencia de algún compuesto estrogénico o con acción similar presente probablemente en el alimento balanceado (Pellisero *et al.*, 1989; Pellisero y Sumpter, 1991) o en el ambiente, con la consecuente aparición de VTG (Sumpter, 1999; Fent *et al.*, 1999; Hylland, 1999) inclusive en los machos (Fitzpatrick *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1999; Flammarion *et al.*, 2000). Sin embargo estas causas no se pueden considerarse con certeza en este estudio ya que no existe evidencia al respecto.

Existe la posibilidad de que algunos machos de *A. tropicus* bajo condiciones normales produzcan VTG ya que en otras especies de peces se han detectado machos produciendo vitelogenina aún sin haber sido tratados con estrógenos. En el caso de *Acanthopagrus schlegeli* se observó que el plasma de estos individuos puede reaccionar positivamente a anticuerpos anti-VTG de la misma especie (Chang *et al.*, 1996). En este mismo estudio también se observó que generalmente en los machos los niveles de VTG son inferiores a 0.6 mg/ml. Esto coincide con Patiño (com. pers., 2001); quien indica que en algunas especies es posible observar de forma normal niveles de VTG en machos, inclusive similares a los producidos por las hembras maduras.

La posibilidad de identificación del sexo de *A. tropicus* implica necesariamente la cuantificación de los niveles en aquellos ejemplares de edad reproductiva positivos a VTG. Al ser una proteína relacionada con la maduración del ovocito no se encuentra presente en ejemplares inmaduros (Heppell y Sullivan, 1999). Los valores empleados para la identificación de sexos en el primer ensayo pueden ser útiles considerando que fueron efectivos para reconocerlo y planificar los desoves. La inducción inicial con las hembras que presentaron niveles superiores a 3.0 mg/ml de VTG permitió constatar que estaban maduras. Por otro lado, las hembras que presentaron en la misma fecha niveles superiores a 1.4 mg/ml al desovar posteriormente; indican que aparentemente estas se encontraban en el proceso de vitelogénesis pudiendo alcanzar niveles superiores con el avance de la temporada. Estos resultados concuerdan con los resultados de Tyler *et al.*, (1990) en *Oncorhynchus mykiss*. En esta especie se ha observado que el incremento en las concentraciones plasmáticas de VTG está fuertemente asociado a un incremento en el peso y tamaño de los ovocitos durante la vitelogénesis, siendo la concentración de VTG de 1.5 mg/ml al inicio de la misma y llegando hasta 25 mg/ml a la ovulación. Resultados similares han sido observados por Heppell y Sullivan, (1999) en *Mycteroperca microlepis* donde la VTG no pudo ser detectada en hembras con ovocitos en estadios de crecimiento inicial. La proteína aparece cuando los ovocitos inician su incremento en peso y manifiesta su valor máximo de ~3 mg/ml en hembras en vitelogénesis tardía, fase de maduración final y ovulación. Asimismo en el caso de *Sardinops melanostictus* los

niveles de VTG al inicio de la vitelogénesis son de 0.56 mg/ml, incrementándose sustancialmente hasta 1.45 mg/ml en la vitelogénesis tardía (Matsubara *et al.*, 1995).

En caso de observarse falsos positivos en organismos silvestres y debido a que no se conoce la fluctuación de los niveles de VTG de los machos de pejelagarto durante la temporada reproductiva (especialmente a su inicio), algunos de estos organismos podrían ser catalogados erróneamente como hembras. De la misma manera, las hembras que inician tarde la vitelogénesis pueden ser erróneamente identificadas como machos debido a niveles bajos de VTG. Es posible que la presencia de VTG en machos ocurra con un número reducido de ejemplares, siendo necesario cuantificarla para la identificación de los sexos. En el caso de las hembras se requerirá de revisión histológica para conocer el estadio de madurez asociado a un nivel de VTG, de tal forma que se obtenga el comportamiento típico de la especie durante el ciclo reproductivo. Esta información será conveniente porque permitirá conocer las proporciones sexuales de ejemplares adultos de pejelagarto y el estadio de madurez gonádica tanto de ejemplares en cautiverio como silvestres. También podría estimarse la proporción sexual de organismos colectados por las pesquerías considerando que la VTG también se puede cuantificar en extractos de músculo (Heppell y Sullivan, 2000) y moco (Chang *et al.*, 1996).

Debido a que el nivel más bajo de vitelogenina detectado en los organismos en los que la inducción hormonal para el desove fue efectiva fue de 2.36 mg/ml, proponemos que los valores superiores a 3.0 mg/ml podrían emplearse como indicadores para garantizar el éxito de las inducciones en esta especie. Probablemente esta concentración de VTG se encuentre cercana al valor máximo que se presenta en pejelagarto cuando culmina la vitelogénesis, indicando que los ovocitos están listos para ser ovulados. Un comportamiento similar se ha observado en *Dicentrarchus labrax* en el cual se alcanza un nivel máximo de VTG dos meses antes del desove (3 mg/ml), manteniéndose constante durante y algunos días después del desove para posteriormente decaer (Mañanós *et al.*, 1994a; Asturiano *et al.*, 2000). En *Ictalurus punctatus* se ha observado también un incremento durante la maduración de los ovocitos, alcanzando hasta 30.21 mg/ml. Este valor disminuye considerablemente justo después del desove alcanzando valores

promedio de 3.79 mg/ml (Pacoli *et al.*, 1990). Estos resultados son consistentes con datos obtenidos en otros peces teleosteos (Tyler *et al.*, 1990; Heppell y Sullivan, 1999).

La cuantificación en *A. tropicus* de los niveles de VTG puede llegar a ser un indicador adecuado del estado de madurez de la gónada, su susceptibilidad a la inducción del desove y la culminación de la temporada reproductiva. Estos valores han sido empleados con éxito en otras especies de peces (Matsubara *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1994; Takemura y Teruya, 1997; Fujita *et al.*, 1998; Heppell y Sullivan, 1999). Estos autores también sugieren que se requiere conocer el estadio de madurez gonádica asociado a la concentración de la proteína para que las inducciones sean más efectivas

La técnica SRID empleada en pejelagarto para medir la concentración plasmática de VTG fue efectiva en un rango amplio de concentraciones. Esta misma técnica se ha empleado exitosamente como un medio para la cuantificación de las proteínas asociadas a la vitelogénesis (Chiba *et al.*, 1994; Matsubara y Sawano, 1995; Matsubara y Koya, 1997; Fujita *et al.*, 1998), siendo efectiva a concentraciones bajas (Shimizu *et al.*, 2000).

Los resultados de la inducción señalan que las hormonas análogas de factores liberadores de gonadotropinas des-Gly¹⁰-(D-Ala⁶)LHRH etilamnída, D-Ala⁶-LHRHa y Ovaprim pueden ser empleados como agentes inductores del desove en *A. tropicus*. La carencia de desoves en los organismos de los grupos control valida ampliamente estos resultados. La acción de estos compuestos en *A. tropicus* es probablemente similar a la que se presenta en *Cynoscion xanthulus* caracterizada por la maduración final ovocitaria (FOM) y desove (Thomas *et al.*, 1994). La efectividad de estos análogos de GnRH ha sido demostrada en varias especies ya que una sola dosis de 100 µg/kg de LHRH ha permitido obtener hasta un 92% de eficiencia en la ovulación en *Micropogonias undulatus* (Gwo *et al.*, 1993). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Brzuska y Adamek (1999) en *Silurus glanis* quienes obtuvieron una eficiencia de ovulación del 100% al administrar 20 µg/kg de des-Gly¹⁰ combinada con 10mg/kg de pimozido y del 80% con Ovaprim (0.33 mL/kg). Una ventaja adicional es que generalmente solo se requiere una dosis con respecto a otros métodos como la hipofisación o el uso de la

gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual además a través de su uso repetido provoca resistencia antigénica. Estos métodos, generalmente requieren más de una inyección (Drori *et al.*, 1994; Kucharczyk *et al.*, 1997;) incrementando el manejo de ejemplares y el esfuerzo cuando son grupos numerosos de reproductores; o bien, solo son efectivos cuando los ovocitos han iniciado FOM (Weber *et al.*, 2000).

El tiempo más corto de respuesta a los estimuladores del desove se observó en los análogos (des-Gly¹⁰ y D-Ala⁶). Esto coincide con Alok *et al.* (1993) quienes observaron una eficiencia del 100% en desoves con un tiempo de 14 a 18 horas en *Heteropneustes fossilis* al suministrar sGnRH. Resultados similares fueron obtenidos por Brzuska (2000) quien empleó una mezcla de kobarelina (des Gly¹⁰ -D-Ala⁶ - GnRH Etilamida) y metoclopramida (20 µg y 10 mg/kg respectivamente) en *Cyprinus carpio*. En este caso obtuvo la ovulación entre 16 y 19 horas comparado con el suministro de Pituitaria de Carpa (PC) que demoró 12 horas después de la segunda inyección (24 horas en total). Las variaciones en la respuesta al desove en *A. tropicus* probablemente estén también relacionadas con el estadio de madurez final del ovocito. Este proceso es acelerado por efecto de las gonadotropinas (Nagahama y Yamashita, 1989; Nagahama, 1990; Patiño y Thomas, 1990; Yaron, 1995) que son liberadas bajo acción de los de GnRH endógenos y análogos sintéticos (Aida, 1983; Yaron, 1995). Estos resultados se han observado en *Cyprinus carpio*, *Morone chrysops* y en *Stizosteidon vitreum* especies en las que estos análogos promueven la ruptura de la vesícula germinativa (GVBD) indicando que el ovocito está próximo a ser ovulado (Drori *et al.*, 1994; Mylonas *et al.*, 1997; Malison *et al.*, 1998). Los resultados de los experimentos 1 y 2 de este estudio, así como los desoves exitosos fuera de la temporada normal de los ejemplares de laboratorio (agosto) son consistentes con respecto a que las hembras de pejelagarto probablemente mantengan los ovocitos listos para ser desovados por un tiempo amplio, en espera de las condiciones que propicien la FOM. En este sentido, Asturiano *et al.* (2000) han observado resultados similares en *Dicentrarchus labrax*. En esta especie la FOM se puede presentar en un rango amplio de tiempo cuando la vitelogénesis ha culminado. De la misma manera, dicha respuesta individual puede depender de factores externos o internos que controlan la secreción de hormonas a nivel del eje reproductivo neuroendocrino como se ha

observado en *Acipenser transmontanus* (Doroshov *et al.*, 1997) desencadenándola bajo condiciones adecuadas o inhibiéndola por el estrés causado por la manipulación (Björnsson *et al.*, 1998).

Considerando lo anterior, la temporada de desoves de *A. tropicus* en laboratorio pudo ampliarse de dos semanas en agosto a casi cuatro meses (julio-octubre) mediante el uso conjunto de niveles de VTG y de las inyecciones de los análogos. Esto permitió obtener crías de buena calidad con alta supervivencia durante fases de la temporada reproductiva en las que no ocurre el desove de forma natural (especialmente al inicio y final), según nuestra experiencia con la especie. Respuestas similares se han descrito en otras especies de peces. En *Ictalurus punctatus* la utilización de LHRH y pimozido permiten mejorar la calidad de los desoves cuando se aplican a inicios de la temporada reproductiva. (Silverstein, *et al.*, 1999). Por otro lado, en el caso de *Stizosteidon vitreum* el desove se puede obtener 10 semanas antes de la temporada normal con la administración de des-Gly¹⁰ y hGC mediante inyección; obteniéndose huevos y larvas con calidad equivalente a las de la temporada normal (Malison *et al.*, 1998). De igual forma, la administración de implantes con los análogos de GnRH puede ser una alternativa para acelerar la maduración y obtener el desove como lo han reportado Mugnier *et al.* (2000) en *Scophthalmus maximus*; Alok *et al.* (1994) en *Heteropneustes fossilis* quienes lograron la madurez de las hembras 4 meses antes de la temporada con tasas de eclosión entre 60-70%. Con este mismo método, Crim y Glebe (1984) obtuvieron un 30% de desoves 45 días antes de la temporada normal en *Salmo salar*.

Las tasas de fertilización de los dos experimentos de este estudio en donde fueron suministrados los análogos fueron altas. Esto sugiere que los niveles de vitelogenina empleados como indicador son adecuados para seleccionar a las hembras susceptibles a la inducción del desove, produciendo tasas de fertilización > 96 %. Resultados similares se han obtenido en *Cynoscion xanthulus* donde inyecciones de LHRH y pimozide han permitido valores de fertilización de hasta 84.4%, mientras que en los controles solo se obtuvo el 1.2% (Thomas *et al.*, 1994). De igual manera, Alok *et al.*, (1993) demostraron que la tasa de eclosión de huevos producidos por inyección de análogo de GnRH de

salmón fue normal (50%) en *Heteropneustes fossilis*, mientras que en el grupo control no se observaron desoves.

No obstante, la aplicación de estimuladores de desove no siempre produce resultados satisfactorios, así por ejemplo, Silverstein *et al.*, (1999) observaron que la tasa de fertilización en *Ictalurus punctatus* fue ligeramente mayor cuando al aplicar LHRH, comparada con el control, aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas. Por otro lado Ako *et al.*, (1994) encontraron que en *Chanos chanos* la inducción con el análogo des-Gly¹⁰ (D-Ala⁶) LHRHe produjo una respuesta contraria; las tasas de eclosión de 37.3% fueron inferiores a las de los desoves naturales (> 91%); de igual manera que en el caso de *Salmo trutta* donde el acelerar el desove administrando análogos redujo substancialmente la tasa de fertilización debido probablemente a que los ovocitos fueron ovulados sin completar la FOM (Mylonas *et al.*, 1992).

Las observaciones de las muestras de semen obtenidas del testículo indicaron que los machos de pejelagarto estaban listos para el desove desde inicios de la temporada, manteniéndose maduros a lo largo de ella y estando aptos para fertilizar huevos aún después de las fechas en las que típicamente se observan eventos reproductivos. Aún cuando no fueron inyectados, resultaron fértiles y activos durante el desove. Esto coincide con los datos reportados por Tucker *et al.* (1991) para *Epinephelus striatus* y Holland *et al.* (1996) para *Morone saxatilis*. En estas especies se observó que los machos son fértiles desde inicios de la temporada reproductiva, siendo la madurez de las hembras la que condiciona el desove. Un comportamiento inverso fue observado por Mayes *et al.*, (1993) en *Micropterus salmoides floridanus* en donde los desoves inducidos no fueron viables cuando solo se inyectó a las hembras con GnRH y hCG debido a que los machos aparentemente no culminaron la espermiación.

El bajo nivel de fertilización observado en la hembra tratada con Ovaprim puede estar asociado a consecuencias de la manipulación excesiva durante la aplicación de las diversas inyecciones de aceite previas, ya que este organismo pertenecía al grupo control

del primer experimento. Esto también se reflejó en la tasa de supervivencia de las crías obtenidas en este desove a la primera alimentación y durante el cultivo larval.

El análisis de covarianza de los resultados de tamaño y peso de los huevos y larvas indican, que no existen diferencias significativas en los tratamientos del experimento 2 cuando se emplea como co-factor el peso de la hembra, existiendo una fuerte asociación entre ambas variables. Esto fue confirmado en el análisis de regresión lineal simple. En el caso del experimento 1, probablemente se comporte de la misma manera aunque el análisis no se realizó debido al reducido número de observaciones. Tamaru *et al.* (1988) han encontrado resultados coincidentes en *Chanos chanos* al no observar diferencias en el diámetro de los huevos por efectos de la hormona LHRHa utilizando dosis de 1 a 65 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Según se ha observado en algunas especies el peso de la hembra depende de la edad, alimentación y tasa de crecimiento específica de cada individuo (Tucker, 1994; Doroshov *et al.*, 1997; Tan-Fermin *et al.*, 1997).

Es posible que todos aquellos factores que afectan a las hembras de pejelagarto durante la maduración gonádica produzcan un efecto directo sobre los huevos y la calidad de las larvas producidas. Este comportamiento se ha observado en larvas de *Perca flavescens* producidas por hembras sometidas a diferentes tratamientos de temperatura y fotoperiodo durante la maduración gonadal (Ciereszko *et al.*, 1997). En *Dicentrarchus labrax*, el suministro de dietas comerciales durante el proceso de maduración produce niveles inferiores de VTG, comparado con dietas naturales. Esto se refleja en una tasa de eclosión y viabilidad de huevos muy baja (Navas *et al.*, 1998).

La calidad de las larvas obtenidas después del periodo de larvicultura indican que la inducción temprana al desove apoyada en los niveles de VTG puede ser una herramienta adecuada para eficientizar la producción de postlarvas de *A. tropicus*. Los desoves se pueden distribuir a lo largo de la temporada reproductiva y facilitar el manejo durante las etapas tempranas de crianza. Esto permitirá la optimización de las instalaciones de producción de larvas de pejelagarto.

7. CONCLUSIONES

Es posible realizar la identificación del sexo de ejemplares adultos de *Atractosteus tropicus* mediante la detección y cuantificación de la Vitelogenina plasmática, empleando suero anti-VTG producido a partir de la proteína purificada.

El suero anti-VTG reacciona positivamente en presencia de plasma de machos tratados con estradiol, hembras maduras y extractos de huevo de pejelagarto, lo cual confirma que la proteína purificada es VTG de *A. tropicus*.

La identificación del sexo de esta especie empleando los niveles de VTG, evita el uso de métodos invasivos; estos mismos niveles pueden ser un indicador efectivo del estado de madurez gonádica y susceptibilidad al desove.

Los análogos superactivos de los factores liberadores de gonadotropinas (*des-Gly*¹⁰- (*D-Ala*⁶) LHRH ethylamide y *D-Ala*⁶-LHRHa) y Ovaprim, pueden ser empleados como agentes inductores del desove en *A. tropicus*, permitiendo obtener larvas de calidad adecuada.

El empleo conjunto de los niveles de VTG y de los agentes inductores mencionados, permite programar los desoves durante la temporada, de dos semanas a cuatro meses.

8. LITERATURA CITADA.

- AIDA, K. 1983. *Effect of LH-Releasing Hormone on Gonadal Development in Salmonoid fish, the Ayu*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 49(5): 711-718.
- ALEMAN, L. y W. CONTRERAS. 1987. *Algunas consideraciones sobre el pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y descripción de sus hábitos alimenticios*. Memorias del IX congreso nacional de Ictiología. 13-16 de Octubre. Tabasco, México.
- ALOK, D., T. KRISHNAN, D. SALUNKE., H. GUPTA., G. P. TALWAR and L. C. GARG. 1994. *Precocious ovarian recrudescence and induced off-season spawning of *Heteropneustes fossilis* by D-Lys⁶ salmon gonadotropin releasing hormone analog (sGnRH-A)*. Journal of fish biology 45:909-915.
- ALOK, D., T. KRISHNAN., G. P. TALWAR and L. GARG. 1993. *Induced spawning of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), using D-Lys⁶ salmon gonadotropin-releasing hormonal analog*. Aquaculture 115: 159-167.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L., D. GUERRERO-TORTOLERO and J. C. PEREZ-URBIOLA. 2001. *Validation of an ovarian biopsy method in sea bass, *Centropomus medius* Günther*. Aquaculture Research 32: 379-384.
- ALVAREZ-LAJONCHERE, L. y O. G. HERNANDEZ M. 2001. *Producción de Juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: Diseño, operación y tecnologías*. World Aquaculture Society-Latinoamerican Chapter. 422 p.
- AKO, H., C. S. TAMARU and C. LEE. 1994. *Chemical and physical differences in milkfish (*Chanos chanos*) eggs from natural and hormonally induced spawns*. Aquaculture 127: 157-167.
- ASTURIANO, J. F., L. A. SORBERA, J. RAMOS, D. E. KIME, M. CARRILLO and S. ZANUY. 2000. *hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach*. Journal of fish Biology 56: 1155-1172
- BERLINSKY, D. L., W. KING, R. HODSON and C. V. SULLIVAN. 1997. *Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus**. Journal of the World Aquaculture Society 28(1): 79-86.
- BERLINSKY, D. L., W. KING, T. SMITH, R. D. HAMILTON, J. HALLOWAY and C. V. SULLIVAN. 1996. *Induced ovulation of summer flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants*. Journal of the World Aquaculture Society 2(2):143-151.

- BJÖRNSSON, B. T., Ó. HALLDÓRSSON, C. HAUX, B. NORBEG and C. L. BROWN. 1998. *Photoperiod control of sexual maturation of the Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus): plasma thyroid hormone and calcium levels.* Aquaculture 166: 117-140.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- BRZUSKA, E. 2000. *Artificial spawning of carp Cyprinus carpio L.: differences between the effects on reproduction in females of Polish and Hungarian provenance treated with carp pituitary and (D-Ala⁶) GnRH proNHet (Kobarelin).* Aquaculture Research 31: 457-465.
- BRZUSKA, E. and J. ADAMEK. 1999. *Artificial spawning of European catfish Silurus glanis L.: stimulation of ovulation using LHRH-a, Ovaprim and carp pituitary extract.* Aquaculture Research 30: 59-64.
- CARNEVALI, O. and P. BELVEDERE. 1991. *Comparative studies of Fish, Amphibian and Reptilian Vitellogenins.* The journal of Experimental Zoology 259:18-25.
- CHAN, S. L., C. H. TAN, M. K. PANG and T.J. LAM. 1991. *Vitellogenin ourification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (Oreochromis niloticus, Linnaeus 1766).* The Journal of Experimental Zoology 257: 96-109.
- CHANG, C. F., E. L. LAU, B. Y. LIN and S. R. JENG. 1996. *Characterization of vitellogenin induced by estradiol 17-β in protandrus black porgy, Acanthopagrus schlegeli.* Fish Physiology and Biochemistry 15 (1): 11-19.
- CHÁVEZ, M., A. MATTHEEUWS y M. PÉREZ. 1989. *Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura.* INIREB-FUCID. Xalapa, Veracruz, México. 222p
- CHIBA, H. , K. IWATSUKI, K. HAYAMI, A. HARA and K. YAMAUCHI. 1994. *Changes in serum steroid hormones and vitellogenin levels in cultured female European eels Anguilla anguilla during artificial induced ovarian development.* Journal of the World Aquaculture Society 25(4): 553-559.
- CIERESZKO, R. E., K. DABROWSKI., A. CIERESZKO., J. EBELING and J. S. OTTOBRE. 1997. *Effects of temperature and photoperiod on reproduction of female yellow perch Perca flavescens: Plasma concentrations of steroid hormones. spontaneous and induced ovulation, and quality of eggs.* Journal of the world aquaculture Society 28(4): 344-356.

- CONTRERAS, W. 1988. *Implementación de un semicultivo del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) en la comunidad del espino municipio del Centro, Tabasco.* Informe Técnico Secretaría de Educación Pública C8703-382. 30 p.
- CONTRERAS, W. y L. ALEMÁN. 1987. *Aspectos reproductivos y desarrollo embrionario del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill), en el estado de Tabasco.* Memorias del IX congreso nacional de Zoología. 13-16 de Octubre. Tabasco, México.
- CONTRERAS, W. 1990. *Monitoreo de las poblaciones de pejelagarto *Atractosteus tropicus* en el estado de Tabasco, México.* Informe técnico. SEDUE. 60 p.
- CONTRERAS, W. y G. MÁRQUEZ. 1988. *Crecimiento y alimentación de *Lepisosteus tropicus* en áreas confinadas, Tabasco, México.* Resúmenes de la semana de investigación y cine científico. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 1:28.
- CONTRERAS, W., G. MÁRQUEZ y J. L. GARCÍA. 1989. *Habilitación de zonas pantanosas para el semicultivo del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* una propuesta para el manejo del ecosistema.* En: Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. pp 15-19.
- CONTRERAS, W. y S. MARAÑÓN. 1991. *Utilización de modelos matemáticos para la determinación del sexo del pejelagarto *Lepisosteus tropicus*: una propuesta para el manejo de la especie.* En Memorias del I simposio sobre desarrollo socioeconómico de los humedales. 5-8 de Noviembre. Matanzas, Cuba. p. 48.
- CONTRERAS, S. W., C. B. SCHRECK, M. S. FITZPATRICK and C. B. PEREIRA. 1998. *Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).* Biology of Reproduction 58: 439-447.
- CRAIK, J.C. and S. M. HARVEY. 1984. *A biochemical method for distinguishing between sexes of fishes by presence of yolk protein in the blood.* Journal of Fish Biology 25: 293-303.
- CRIM, L. W., D. M. EVANS and B. H. VICKERY. 1983. *Manipulation of seasonal reproductive cycle of the Landlocked Atlantic salmon *Salmo salar* by LHRH analogues administered at various stages of gonadal development.* Canadian Journal of fisheries and Aquatic Sciences 40:61-67.
- CRIM, L. W. and B. D. GLEBE. 1984. *Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog.* Aquaculture 43: 47-56.
- DANIEL, W. W., 1990. *Applied nonparametric statistics.* The Duxbury advanced series in statistic and desition sciences. PWS-Kent Publishing Company, Boston U.S.A. 635 p.

- DE VLAMING, V. L., H. S. WILEY, G. DELAHUNTY and R. A. WALLACE. 1980. *Goldfish (Carassius auratus) vitellogenin induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins*. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 613-623.
- DÍAZ, E. 1969. *Anatomía del tubo digestivo de Lepisosteus tropicus (Gill, 1863)*. Tesis de Licenciatura. Instituto Politécnico Nacional. México, 23 p.
- DOROSHOV, S. I., G. P. MOBERG and J. P. VAN EENENNAAM. 1997. *Observations on the reproductive cycle of cultured sturgeon Acipenser transmontanus*. *Environmental Biology of Fishes* 48: 265-278.
- DRORI, S., M. OFIR, B. LEVAVI-SIVAN and Z. YARON. 1994. *Spawning induction in common carp (Cyprinus carpio) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature*. *Aquaculture* 119:393-407.
- ESPINOZA, H., M. GASPAR y P. FUENTES., 1993. *Listados Faunísticos de México: III.- Los Peces dulceacuicolas Mexicanos*. Instituto de Biología. UNAM. México. 99 p.
- FENT, K., G. ACKERMANN and J. SCHOWAIGER. 1999. *Long-term effects of nonylphenol on vitellogenin and zona radiata protein expression in juvenile rainbow trout..* In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen 4.9 July. 499 p.
- FERRARA, A. M. and E. R. IRWIN. 2001. *A standardized procedure for internal sex identification in Lepisosteidae*. *North American Journal of Fisheries Management* 21(4): 956-961.
- FLAMMARION, P., F. BRION, M. BABUT, J. GARRIC, B. MIGEON, P. NOURY, E. THYBAUD, C. R. TYLER and X. PALAZZI. 2000. *Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (Leuciscus cephalus)*. *Ecotoxicology* 9: 127-135.
- FLETT, P.A. and J. F. LEATHERLAND. 1989. *Dose-related effects of 17 β -oestradiol (E_2) on liver weight, plasma E_2 , protein, calcium and thyroid hormone levels, and measurement of the binding of thyroid hormones to vitellogenin in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson*. *Journal of fish Biology* 34:515-527.
- FITZPATRICK, M. S., G. W. FEIST, E. P. FOSTER and C. B. SCHRECK. 1999. *Reproductive biomarkers in white sturgeon: is endocrine disruption occurring in the Columbia river?*. In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen 4.9 July. 499 p.

- FITZPATRICK, M., J. REDDING., F. D. RATTI and C. B. SCHRECK. 1987. *Plasma testosterone concentration predicts the ovulatory response of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to gonadotropin-releasing hormone analog*. Canadian Journal of fisheries and aquatic sciences 44(7): 1351-1357.
- FOSTIER, A., B. JALABERT., R. BILLARD., B. BRETON and Y. ZOHAR. 1983. *The Gonadal Steroids*. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). Fish Physiology, Vol. IXA. Academic Press, New York, N.Y. pp. 277-372.
- FUJITA, T., A. TAKEMURA and K. TAKANO. 1998. *Immunochemical detection of precursors proteins yolk and vitelline envelope, and their annual changes in the blood of *Diodon holocanthus**. Journal of fish biology 52:1229-1240.
- GÓMEZ, M. 1989. *Reproducción del pejelagarto en estanquería rústica*. En: Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. pp 13-14
- GORBMAN, A. 1983. *Reproduction in Cyclostome fishes and its regulation*. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). Fish Physiology, Vol. IXA. Academic Press, New York, N.Y. pp. 1-30
- GRIER, J. H. 1991. *Environmental control of reproduction in a livebearing fish*. American Zoologist. 31(5): 1-36.
- GWO, J. C., S. STRAWN and C. R. ARNOLD. 1993. *Induced ovulation in atlantic croaker (*scianidae*) using hCG and LHRH analog: a preliminary study*. Theriogenology. 39: 353-361.
- HAMAZAKI, T. S., I. IUCHI and K. YAMAGAMI. 1987. *Purification and identification of vitellogenin and its immunohistochemical detection in growing oocytes of the teleost *Orizias latipes**. The Journal of Experimental Zoology 242:333-341.
- HARVEY, B. J. NACARIO, L.W. CRIM, J. V. JUARIO and C. L. MARTE. 1985. *Induced spawning of sea bass *Lates calcarifer*, and rabbitfish *Siganus guttatus*, after implantation of pelleted LHRH analog*. Aquaculture 47: 53-59.
- HEAD, W. D., W. O. WATANABE, S. C. ELLIS and E. P. ELLIS. 1996. *Hormone induced multiple spawning of captive Nassau grouper broodstock*. The progressive fish-culturist 58:65-69.
- HEPPELL, A. S. and C. V. SULLIVAN. 1999. *Gag (*Mycteroperca microlepis*) vitellogenin: purification, characterization and use for enzyme-linked*

immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper. Fish Physiology and Biochemistry 20: 361-374.

HEPPELL, A. S. and C. V. SULLIVAN. 2000. *Identification of gender and reproductive maturity in the absence of gonads: muscle tissue levels of sex steroids and vitellogenin in gag (Mycteroperca microlipis)*. *Canadian Journal of Aquatic Science* 57: 148-159.

HERNANDEZ, V. U. 1999. *Punto crítico de no retorno en larvas de Pejelagarto Atractosteus tropicus (Gill)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 46 p.

HERNÁNDEZ, V. U., G. MÁRQUEZ., S. PÁRAMO., S. FÉLIX y S. HERNÁNDEZ, 1997. *Valor nutritivo de nauplios de Artemia spp. y su uso en la larvicultura del pejelagarto Atractosteus tropicus*. En: Memoria de la semana de investigación y divulgación científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de 1997. pp 65-68.

HOLLAND, C. M., C. C. MYLONAS and Y. ZOHAR. 1996. *Sperm characteristics of precocious 1-year-old male striped bass Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 27(2): 208-212.

HYLLAND, K. 1999. *The Use of juvenile atlantic cod to monitor environmental estrogens*. In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen 4-9 July. 499 p.

KHOO, K. H. 1979. *The histochemistry and endocrine control of vitellogenesis in goldfish ovaries*. *Canadian Journal of Zoology* 57: 617-626.

KOMATSU, m., w. MATSUMOTO and S. HAYASHI. 1996. *Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B (3): 561-571.

KUCHARCZYK, D., R. KUJAWA, M. LUCZYNSKY, J. GLOGOWSKI, I. BABIAK and E. WYSZORMIRSKA. 1997a. *Induced spawning in bream Abramis brama (L.), using carp and bream pituitary extract and hCG*. *Aquaculture Research* 28:139-144.

KUCHARCZYK, D., R. KUJAWA, A. MAMCARZ, A. SKRZYPCZAK and E. WYSZORMIRSKA. 1998. *Induced spawning perch, Perca fluviatilis L. using FSH + LH with pimozide or metoclopramide*. *Aquaculture Research* 29: 131-136.

LAINE, A. (1992). *Quantitative and Qualitative immunoelectrophoresis. (Ch.20)*. In: *Methods in molecular biology, Immunochemical protocols. The press Inc., Totowa NJ*. M.Manson (ed), 10: 195-200

- LE BAIL, P. Y. and B. PRETON. 1981. *Rapid determination of the sex of puberal salmonid fish by a technique of immunoagglutination*. *Aquaculture* 22:367-375.
- LAEMMMLI, U. K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227: 680-685.
- LAINE, A. (1992). Rocket immunoelectrophoresis technique or electroimmunodiffusion. (Ch.21). In: *Methods in molecular biology, Immunochemical protocols*. The press Inc., Totowa NJ. M.Manson (ed), 10: 201-205.
- LIN, F., A. CIERESZKO and K. DABROWSKI. 1996. *Sperm production and cryopreservation in muskellunge after carp pituitary extract and human chorionic gonadotropin injection*. *The progressive fish-culturist* 58:32-37.
- LINARES-CASENAVE, J. 1993. *Development of an Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of blood plasma vitellogenin in white sturgeon, Acipenser transmontanus*. Master of Science Thesis. University of California, Davis, CA. USA. 69 p.
- MALDONADO, E. 1991. *Aprovechamiento de peces forrajeros en la alimentación de Atractosteus tropicus (Gill) en jaulas flotantes en el estado de Tabasco, México*. *Universidad y Ciencia* 8(15):77-90.
- MALISON, J. A., L. S. PROCARIONE, T. B. KAYES, J. H. HANSEN and J. A. HELD. 1998. *Induction of out-of-season spawning walleye (Stizostedion vitreum)*. *Aquaculture* 163: 151-161.
- MANCINI, G., A. O. CARBONARA and J. F. HEREMANS 1965. *Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion*. *Immunochemistry* 2: 235-254.
- MAÑANÓS, E., J. NÚÑEZ, S. ZANUY, M. CARRILLO and LE MENN. 1994a. *Sea bass (Dicentrarchus labrax L.) vitellogenin. II- Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(2): 217-223.
- MAÑANÓS, E., S. ZANUY, LE MENN, M. CARRILLO and J. NÚÑEZ. 1994b. *Sea bass (Dicentrarchus labrax L.) vitellogenin. I- Induction, purification and partial characterization*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(2): 205-216.
- MARQUEZ, G. 1999. *Biología y Tecnología para el Cultivo del pejelagarto en el sureste de México*. En: *Memorias de la IV Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura SEMARNAP-INP-DGIC*. Cuernavaca, Morelos 19-21 de Octubre 1999. México. pp. 265-268.

- MÁRQUEZ, G., S. PÁRAMO., C. BAUTISTA., U. HERNÁNDEZ., S. FÉLIX., D. CASTILLO., S. SANTIAGO., H. GUZMAN., L. ARIAS., F. GONZÁLEZ. y L. DORANTES. 1997. *Efecto del fotoperiodo en el crecimiento y supervivencia de larvas del pejelagarto *Atractosteus tropicus**. En: Memoria de la semana de investigación y divulgación científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de 1997 . pp 76-79.
- MARQUEZ, P. H. 1998. *Efectos de la temperatura en el desarrollo de embriones y en el crecimiento de larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus* bajo condiciones de Laboratorio*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tabasco, México. 43 p.
- MATSUBARA, T. and K. SAWANO. 1995. *Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*)*. The Journal of Experimental Zoology 272:34-45
- MATSUBARA, T., S. HONDA, T. WADA, K. SOYANO and A. HARA. 1995. *Seasonal changes in serum vitellogenin and estradiol 17- β related to sexual maturation in rearing female Japanese sardine *Sardinops melanostictus**. Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst. 59: 19-29.
- MATSUBARA, T., N. OHKUBO, T. ANDOH, C. V. SULLIVAN and A. HARA. 1999. *Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder *Verasper moseri* a marine teleost that spawn pelagic eggs*. Developmental Biology 213: 18-32.
- MATSUBARA, T., T. WADA and A. HARA. 1994. *Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*)*. Comp. Biochem. Physiol. 109B (4): 545-555.
- MATSUBARA, T. and Y. KOYA. 1997. *Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs*. The Journal of Experimental Zoology 278: 189-200.
- MAYES, K. B., P. M. ROSENBLUM and T. M. BRANDT. 1993. *Raceway spawning of florida largemouth bass: effects of acclimation time and hormone treatment on spawning success*. The progressive fish-culturist 55 (1): 1-8.
- MUGNIER, C., M. GUENNOC., E. LEBEGUE., A. FOSTIER and B. BRETON. 2000. *Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot *Scophthalmus maximus* L. broodstock by implantation of sustained-release GnRH-a pellet*. Aquaculture 181: 241-255.

- MYLONAS, C. C., J. M. HINSHAW and C. V. SULLIVAN. 1992. *GnRH-induced ovulation of brown trout (Salmo trutta) and its effects on egg quality*. *Aquaculture* 106: 379-392.
- MYLONAS, C. C., Y. MAGNUS., Y. KLEBANOV., A. GISSIS and Y. ZOHAR. 1997. *Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass*. *Journal of fish biology* 51: 234-250.
- MYLONAS, C., Y. ZOHAR., B. M. RICHARDSON and S. P. MINKKINEN. 1995. *Induced spawning of wild American shad Alosa sapidissima using sustained administration of gonadotropin releasing hormone analog (GnRH α)*. *Journal of the world aquaculture society* 26: 240-251
- MYLONAS, C., Y. ZOHAR., C. WOODS., P. THOMAS and R. SCHULZ. 1998. *Hormone profiles of captive striped bass Morone saxatilis during spermiation and long term enhancement of milt production*. *Journal of World Aquaculture Society* 29(4):379-392.
- NAGAHAMA, Y. 1983. *The functional morphology of teleost gonads*. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). *Fish Physiology*, Vol. IXA. Academic Press, New York, N.Y. pp. 223-275.
- NAGAHAMA, Y. 1990. *Endocrine control of oocyte maturation in teleosts*. *Progress in Comparative Endocrinology*: 358-392.
- NAGAHAMA, Y. and M. YAMASHITA. 1989. *Mechanism of synthesis and action of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost maturing-inducing substance*. *Fish Physiology and Biochemistry* 7(1-4):193-200.
- NAGAHAMA, Y., M. YOSHIKUNI, M. YAMASHITA, N. SAKAI and M. TANAKA. 1993. *Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation on fish*. *Fish Physiology and Biochemistry* 11(1-6): 3.14.
- NAGLER, J. J., S. RUBY, D. R. IDLER and Y. P. SO. 1987. *Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout*. *Canadian Journal of Zoology* 65: 2421-2425.
- NAVAS, J. M., E. MAÑANÓS, M. THRUSH, J. RAMOS, S. ZANUY, M. CARRILLO, Y. ZOHAR and N. BROMAGE. 1998. *Effects of dietary lipid composition on vitellogenin, 17 β estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (Dicentrarchus labrax)*. *Aquaculture* 165: 65-79.
- NG, T. B. and D. IDLER. *Yolk formation and differentiation in Fishes*. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). *Fish Physiology*, Vol. IX A. Academic Press, New York, N.Y. pp. 373-404.

- OUCHTERLONY, Ö. 1953. *Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reaction in coordinated systems of diffusion*. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 32: 231-240.
- PACOLI, C. Q., J. M. GRIZZLE and J. T. BRADLEY. 1990. *Seasonal levels of serum vitellogenin and oocyte growth in the channel catfish *Ictalurus punctatus**. Aquaculture 90:353-367.
- PATIÑO, R. 1997. *Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals*. The progressive fish-culturist 59:118-128.
- PATIÑO, R. and P. THOMAS. 1990. *Gonadotropin stimulates 17α , 20β 21 -trihydroxy-4-pregnen-3-one from endogenous substrates in atlantic croaker ovarian follicles undergoing final maturation in vitro*. General and Comparative endocrinology 78: 474-478.
- PELISSERO, C., B. CUISSET and F. LE MENN. 1989. *The influence of sex steroids in commercial fish meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon *Acipenser baeri**. Aquat. Living Resour. 2: 161-168.
- PELISSERO, C. and J. P. SUMPTER. 1992. *Steroid and "Steroid-like" substances in fish diets*. Aquaculture 107: 283-301.
- PEREZ, E. 1995. *Efecto de la gonadotropina coriónica humana (GCH) en la maduración gonádica del pejelagarto *Atractosteus tropicus* Gill, 1823 en condiciones de laboratorio*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México. 46 p.
- PÉREZ, E. y S. PÁRAMO. 1998. *Estudio Histológico de las gónadas de Pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Lepisoteiformes:Lepisosteidae)*. Universidad y Ciencia 14(27): 69-82.
- PETER, R. E. 1983. *The brain and neurohormones in teleosts reproduction*. . In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (editors). Fish Physiology, Vol. IXA. Academic Press, New York, N.Y. pp. 97-136.
- REDDING, M. J. and R. PATIÑO. 1993. *Reproductive Physiology*. In D. H. Evans (Editor). The Physiology of Fishes Chapter 16. CRC Press, Boca Raton Florida.
- REDDY, P., R. RENAUD and J. F. LEATHERLAND. 1998. *Effect of cortisol and triiodothyronine on ovarian steroidogenesis in vitro in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at two different stages of oocyte maturation*. 1998. In J. Trant, Y. Zohar, A. Place and D. Mackinlay (Editors). International Congress on the biology of fish. Baltimore MD, July 26-30 pp. 95-99

- RESÉNDEZ, A. y M. SALVADORES. 1983. *Contribución al conocimiento de la biología de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* (Günther) del estado de Tabasco*. Biotica 8(4):413-426.
- RODRIGUEZ, G. M. 1992. *Técnicas de Evaluación Cuantitativa de la Madurez Gonádica en Peces*. AGT Editor. México. 79 p.
- SALAMI, A. A., O. A. BELLO-OLUSOJI, O. A. FAGBENRON and Y. AKEGBEJO-SAMSONS. 1997. *Induced breeding of two clariid catfishes *Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis* using tilapia pituitary extracts*. Journal of the world aquaculture Society 28(1): 113-117.
- SATOH, H., K. YAMAMORI and T. HIBIYA. 1992. *Induced sawing of the Japanese eel*. Nippon Suisan Gakkaishi 58(5): 825-832.
- SCHRECK, C. B., W. CONTRERAS-SANCHEZ, and M. S. FITZPATRICK. 2001. *Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny*. Aquaculture 197: 3-24.
- SCOTT, A. P., C. STEWARD, Y. ALLEN and P. MATTHIESSEN. 1999. *17 β oestradiol in male flatfish*. In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Bergen 4.9 July. 499 p.
- SHIMIZU, M., H. FUKADA, T. FUJITA, N. HIRAMATSU and A. HARA. 2000. *Serum levels of precursors to vitelline envelope proteins (choriogenins) in Sakhalin taimen after treatment whit oestrogens and during oocyte growth*. Journal of Fish Biology 57: 170-181.
- SILVERSTEIN, J. T., B BOSWORTH and W. WOLTERS. 1999. *Evaluation of dual injection of LHRHa and dopamine receptor antagonist pimozide in cage spawning of channel catfish *Ictalurus punctatus**. Journal of the World Aquaculture Society 30 (2): 263-268.
- SOWER, A. S., R. N. IWAMOTO., W. W. DICKHOFF and A. GORBMAN. 1984. *Ovulatory and steroidal response in coho salmon and steel trout following administration of salmon gonadotropin and D-Ala⁶, des Gly¹⁰ gonadotropin releasing hormone ethylamide (GnRH α)*. Aquaculture 43: 35-46.
- SUMPTER, J. P. 1999. *Endocrine disrupting chemicals in the aquaculture environment*. In: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson Editors. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Bergen 4.9 July. 499 p.

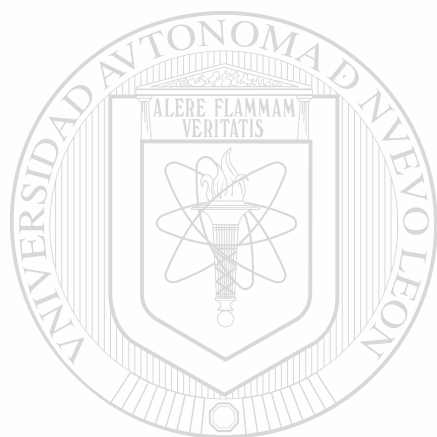
- SUNDARARAJ, B. I., P. NATH and E. BURZAWA-GÉRARD. 1982. Synthesis of vitellogenin and its uptake by the ovary in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) in response to carp gonadotropin and its subunits. *General and comparative Endocrinology* 46: 93-98.
- TAKEMURA, A., A. HARA and K. TACAÑO. 1991. *Immunochemical identification and partial characterization of female-specific serum proteins in white-edged rockfish *Sebastes taczanowskii**. *Environmental Biology of Fishes* 30: 49-56.
- TAKEMURA, A. and M. OKA. 1998. *Immunochemical sexing of living yellow tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin like protein*. *Aquaculture Research* 29: 245-249.
- TAKEMURA, A. and K. TERUYA. 1997. *Purification and partial characterization of the vitellogenin of coral trout *Plectropomus leopardus**. *Bulletin of Marine Science* 61 (3): 791-800.
- TAMARU, C. S., C. S. LEE, C. D. KELLEY, J. E. BANNO, P. Y. HA, K. AIDA and I. HANYU. 1988. *Characterizing the stage of maturity most receptive to an acute LHRH-analogue therapy for induction of milkfish (*Chanos chanos*) to spawn*. *Aquaculture* 74: 147-163.
- TAN-FERMIN, J., R. R. PAGADOR and R. CHAVEZ. 1997. *LHRHa and Pimozide-induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther) at different times during an annual reproductive cycle*. *Aquaculture* 148: 323-331.
- TARANGER, G. L., C. HAUX, S. O. STEFANSSON, B. T. BJÖRNSSON, B. T. WALTHER and T. HANSEN. 1998. *Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol 17- β profiles in Atlantic salmon *Salmo salar**. *Aquaculture* 162: 85-98.
- THOMAS, P., P. COPELAND and J. C. PRENTICE. 1994. *Preliminary observations of the reproductive physiology of female orangemouth corvine in captivity*. *Journal of the World Aquaculture Society* 25(2): 214-224.
- TUCKER, J. W. 1994. *Spawning by captive serranid fishes: a review*. *Journal of the World Aquaculture Society* 25(3): 345-359.
- TUCKER, J. W., J. E. PARSONS, G. C. EBANKS and P. G. BUSH. 1991. *Induced spawning of Nassau grouper *Epinephelus striatus**. *Journal of the World Aquaculture Society* 22(3): 187-191.
- TYLER, C. 1993. *Electrophoretic patterns of yolk proteins throughout ovarian development and their relationship to vitellogenin in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss**. *Comp. Biochem. Physiol.* 106b (2): 321-329.

- TYLER, C., J. P. SUMPTER and N. BROMAGE. 1988. *In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, Salmo gairdneri*. The Journal of Experimental Zoology 246: 171-179.
- TYLER, C. R. J. P. SUMPTER and P. R. WITTHAMES. 1990. *The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Biology of Reproduction 43: 202-209.
- VUTHIPHANDCHAI, V. and Y. ZOHAR. 1999. *Age related sperm quality of captive striped bass Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society 30 (1): 65-72.
- WAAGBOE, R. and K. SANDNES. 1988. *Determination of vitellogenin in serum of rainbow trout (Salmo gairdneri) by high performance gel permeation chromatography*. Journal of Chromatography 427: 138-143.
- WATANABE, W., E. ELLIS and S. ELLIS. 1998. *Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder Paralichthys dentatus broodstock*. Journal of the World Aquaculture Society 29 (4): 293-404.
- WATANABE, W. O., E. P. ELLIS, S. C. ELLIS, J. CHAVEZ., C. MANDREFFI, R. W. HAGOOD., M. SPARSIS and S. ARNESON. 1998. *Artificial propagation of mutton snapper Lutjanus analis A new candidate marine fish species for aquaculture*. Journal of the World Aquaculture Society 29 (2): 176-187.
- WEBER, K. and M. OSBORN. 1969. *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*. Journal Biol. Chem., 244:4406-4412.
- WEBER, G. M., W. KING., R. W. CLARK., R. G. HODSON and C. V. SULLIVAN. 2000. *Morpho-physiological predictors of ovulatory success in captive striped bass Morone saxatilis*. Aquaculture 188:133-146.
- WILEY, H.S., L. OPRESKO, and R. A. WALLACE. 1979. *New method for purification of vertebrate vitellogenin*. Analytical Biochemistry 97: 48-53.
- YAO, Z. and L. CRIM. 1996. *A biochemical characterization of vitellogenin isolated from marine fish ocean pout (Macrozoarces americanus L.), lumpfish (Cyclopterus lumpus) and Atlantic cod (Gadus morhua)*. Comp. Biochem. Physiol. 113B (2): 247-253.
- YARON, Z. 1995. *Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp*. Aquaculture 129: 49-73.

ZAR, J. H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 p.

ZACARÍAS, A., G. MÁRQUEZ., S. PÁRAMO., C. BAUTISTA., L. DORANTES., I. CANDELARIO y A. RAMOS, 1997. *Supervivencia y Crecimiento de juveniles de pejalagarto *Atractosteus tropicus* expuestos a fotoperiodo continuo en la etapa larval*. En: Memoria de la semana de investigación y divulgación científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de 1997. pp 84-87.

ZOHAR, Y. 1998. *Gonadotropin Releasing hormones: why do fish need multiple forms?* 1998. In J. Trant, Y. Zohar, A. Place and D. Mackinlay (Editors). *International Congress on the biology of fish*. Baltimore MD, July 26-30 pp. 1-4

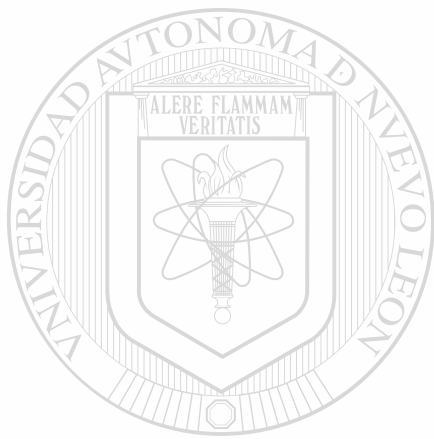


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



