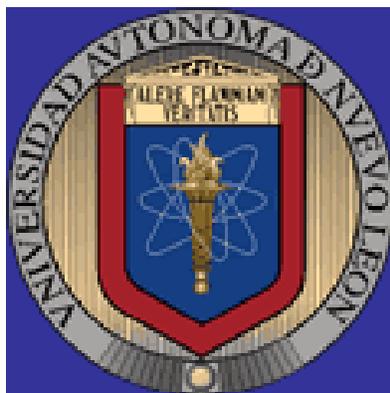


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACTULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CONTROL REPRODUCTIVO Y LARVARIO DEL CATAN
(*Atractosteus spatula*)

Por

MARTIN GONZALEZ LAZCARI

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
con Acentuación en Manejo de Vida Silvestre y Desarrollo Sustentable

Noviembre, 2006

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en especial a la Subdirección de Postgrado por ofrecerme una excelente opción para mi superación, en este espacio debo mencionar a la Dra Julia Verde Star, Subdirectora de Postgrado, por brindarme su apoyo de manera excepcional

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las facilidades en materia económica al mantenerme una beca para la realización del Doctorado por espacio de cuatro años

También todo mi agradecimiento a mi Asesor Dr Roberto Mendoza Alfaro, ejemplo de trabajo y formalidad, quien me apoyo en forma desinteresada ofreciéndome un cúmulo de conocimientos y experiencias en la materia, de la que no me cabe duda es un experto, de igual forma hacer notar su calidad como ser humano y amigo.

Agradezco del mismo modo al Dr Carlos Aguilera González y al Dr Jesús Montemayor Leal parte esencial del equipo de trabajo del laboratorio de Eco fisiología, ya que invirtieron muchas horas de su tiempo en las diversas actividades que requirió este trabajo, y así mismo, contribuyeron con estudios y consejos que lo enriquecieron, agradezco también su amistad sincera

Debo expresar mi agradecimiento a los compañeros del Laboratorio Veronica Melinna Cortez Davila, Olga Santillan Sosa, Ulises Hernandez Vidal, Susana Vela Valladeres e Israel Iracheta Tamez integrantes del equipo de Eco fisiología que apoyaron la realización de esta investigación con sus aportaciones

A Claudia Esposa y compañera de mi vida quien me ha apoyado en todas las aventuras importantes de mi vida

A mis hijos Mariela y Alan por despertar en mi una de las sensaciones mas profundas de la vida que es el amor, mismo que te da el ánimo y entereza para seguir el camino

A mi Madre y mis Hermanos y familia en General por darme la oportunidad de contar con una identidad familiar, condición indispensable para el desarrollo personal de todo individuo

A Lauro, Ciro Victor y Cata personal que labora en la granja Desarrollo Acuícola el Huasteco, por su apoyo y por creer en mi proyecto

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Estimaciones del peso molecular, en diferentes peces	18
II	Composición porcentual de la VTG, en diferentes especies de peces	20
III	Técnicas de cromatografías y electroforesis para la purificación de la vitelogenina en diversas especies	21
IV	Características morfométricas y sexo determinado de los juveniles de La Laja, Veracruz.	39
V	Características morfométricas y sexo determinado de los juveniles de El Huasteco	41
VI	Hormonas utilizadas	65
VII	Bioensayo 1 tratamiento 1 Tancol	67
VIII	Bioensayo 1 tratamiento 2 Tancol	68
IX	Bioensayo 1 tratamiento 3 Tancol	69
X	Bioensayo 1 tratamiento 4 Tancol	70
XI	Bioensayo 2 tratamiento 1 Desarrollo. Acuícola El Huasteco	71
XII	Bioensayo 3 tratamiento Desarrollo. Acuícola El Huasteco	72
XIII	Bioensayo 4 tratamiento Desarrollo. Acuícola El Huasteco	73
XIV	Bioensayo 5 tratamiento Desarrollo. Acuícola El Huasteco	75
XV	Bioensayo 6 tratamiento Desarrollo. Acuícola El Huasteco	76
XVI	Bioensayo 7 tratamiento Desarrollo. Acuícola El Huasteco	77
XVII	Bioensayo 8 tratamiento Desarrollo. Acuícola El Huasteco	78
XVIII	Bioensayo 1 tratamiento 1 Resultados	79
XIX	Bioensayo 1 tratamiento 2 Resultados	79
XX	Bioensayo 1 tratamiento 3 Resultados	80
XXI	Bioensayo 1 tratamiento 4 Resultados	81

XXII	Bioensayo 2 tratamiento Desarrollo Acuícola El Huasteco Resultados	82
XXIII	Bioensayo 3 tratamiento Desarrollo Acuícola El Huasteco Resultados	83
XXIV	Bioensayo 4 tratamiento Desarrollo Acuícola El Huasteco Resultados	84
XXV	Bioensayo 5tratamiento Desarrollo Acuícola El Huasteco Resultados	85
XXVI	Bioensayo 6 tratamiento Desarrollo Acuícola El Huasteco Resultados	86
XXVII	Bioensayo 7 tratamiento Desarrollo Acuícola El Huasteco Resultados	87
XXVIII	Bioensayo 8 tratamiento Desarrollo Acuícola El Huasteco Resultados	88
XXIX	Relación de los tipos de ELISA empleados para cuantificar vitelogenina en diferentes especies de peces	102
XXX	Registro de los ejemplares inducidos	104
XXXI	Primera prueba de optimización de reactivos	116
XXXII	Segunda prueba de optimización de reactivos	116
XXXIII	Absorbancias obtenidas con 3 buffers de unión	128
XXXIV	Valores obtenidos en una prueba de estandarización	128
XXXV	Condiciones finales del ELISA	128
XXXVI	Características del ELISA	129
XXXVII	Concentración de proteína total y VTG en las muestras durante la inducció	130
XXXVIII	Variables morfométricas de larvas de catan alimentadas con diferentes dietas	146
XXXIX	Peso promedio de los organismos año (2002-2006)	163

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	SDS-PAGE de plasma de ejemplares tratados y no tratados con estradiol	31
2	Perfil de fracciones cromatográficas de filtración en gel de Sepharosa 6B de plasma de macho de <i>A. tropicus</i> tratados con 17 β Estradiol	32
3	Pruebas cruzadas entre la VTG purificada y el suero anti-VTG obtenido en conejos	34
4	Fracciones proteicas (Sephacryl-300) del extracto de ovario maduro precipitado,	35
5	Pruebas Cruzadas de extracto de ovario maduro de <i>Atractosteus spatula</i> (y extracto de ovario maduro de <i>A. tropicus</i> (35
6	Determinación del peso molecular de la VTL, en gel de poliacrilamida	36
7	Valores promedio del peso (kg) y longitud (cm) .	37
8	Sexado del lote de reproductores del Centro acuícola de Tancol, mediante la técnica de pruebas cruzadas.	38
9	Sexado del lote de reproductores del Centro acuícola de Tancol, mediante la técnica de electroforesis.	38
10	Sexado del lote de juveniles de La Laja de <i>A. spatula</i> , mediante la técnica de electroforesis	40
11	Sexado del lote de juveniles de La Laja de <i>A. spatula</i> , mediante la técnica de pruebas cruzadas.	41
12	Estímulos Ambientales	56
13	Figura ilustrando el modo de acción de las gonadotropinas vitelogénica y madurativa (GtH- I, GtH-II)	59
14	Maduración ovocitaria	60
15	Intervención de factores extrínsecos, hormonas y sus análogos	61

en la inducción Hormonal

16	ELISA en equilibrio mostrando frecuencia de pasos para alcanzar la reacción máxima	113
17	ELISA -Control Blanco	114
18	ELISA –Reacción Máxima	115
19	Inmunodifusión doble en geles de agarosa con las muestras de plasma y mucus obtenidas durante la inducción.	119
20	PAGE-SDS al 6% que muestra las diferentes concentraciones de VTG en el plasma, durante la inducción	120
21	Perfil de elusión de la filtración en gel de las proteínas plasmáticas del macho inducido	121
22	Análisis por electroforesis de las fracciones de la cromatografía de exclusión.	121
23	Comparación de los resultados de la precipitación selectiva de la VTG mediante electroforesis en PAGE-SDS al 6	122
24	Análisis de proteína	123
25	VTG electroeluida en diferentes ocasiones y <i>Western Blot</i> con dos proteínas electroeluidas	124
26	Inmunodifusión doble de las diluciones del suero de conejo con anticuerpos anti-VTG.	124
27	Perfil de elusión de los anticuerpos por cromatografía de afinidad (proteína A-Sepharosa	124
28	Inmunodifusión doble de las fracciones obtenidas de la purificación con proteína A.	126
29	Plasma de macho inducido	126
30	<i>Western Blot.</i> , con anticuerpos anti-VTG y con anticuerpo de <i>A. tropicus</i> .	127
31	Inmunodifusión donde se emplearon los anticuerpos (anti-VTG) de <i>A. tropicus</i> y de <i>A. spatula</i> ,	127
32	Regresión de la curva de 300 a 1.5 ng de VTG	129
33	Concentración de VTG en plasma y en mucus de los ejemplares inducidos	131

34	Sobre vivencia (%) de larvas con diferentes dietas	144
35	Crecimiento en pesos de larvas	145
36	Crecimiento en peso (g) y longitud (cm) de larvas de catán cultivadas con diferente fase de desarrollo.	147
37	Crecimiento de los juveniles	148
38	Crecimiento específico, factores de (conversión y de condicion) y valores de eficiencia	149
39	Dietas utilizadas para alimentación de larvas de catán: Migajas de extrusión (EC); y Microesferas extrudidas (EM)	151
40	Evolución ponderal de los organismos juveniles capturados y cultivados, mantenidos en la granja El Huasteco y en el Laboratorio de Ecofisiología de la UANL	163

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	7
CAPITULO .-1 IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN LEPISOSTEIDOS	8
CAPITULO 2.- INDUCCION A LA MADUREZ SEXUAL	48
CAPITULO 3.- EVALUACIÓN DE LA MADUREZ SEXUAL	97
CAPITULO 4.- CULTIVO LARVARIO Y CRECIMIENTO DE JUVENILES CON DIETAS ARTIFICIALES	137
CAPITULO 5.- FORMACION DE UN LOTE DE REPRODUCTORES	155
CONCLUSIONES	171
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	173

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
GtH	Gonadotropinas
Gn RH	Factores liberadores de las gonadotropinas
Gn RH-a	Análogos de los factores liberadores de las gonadotropinas
PGF-2	Prostaglandinas
GtH-Like	Moléculas emparentadas con gonadotropinas
FSH	Folículo estimulante
LH	Hormona Leuteinizante
Gn-RIF	Factores inhibidores
sGTH	Extracto de pituitaria de Salmon
SRID	Inmunodifusion simple
RIA	Radio inmunoensayo
VTG	Vitelogenina

RESUMEN

El catán (*Atractosteus spatula*) es el pez dulceacuícola de mayor tamaño en las aguas continentales del Golfo de México. Estos peces han sido capturados tradicionalmente en la región Noreste del país, en donde son muy apreciados tanto por la calidad de su carne como por su tamaño. Como consecuencia de la sobrepesca comercial y deportiva, las poblaciones de catán han declinado drásticamente. Adicionalmente, las capturas se realizan durante su temporada natural de reproducción, afectando el reclutamiento de nuevos juveniles. Las áreas de anidación también han sido dañadas por la expansión agrícola y urbana, así como por la construcción de presas. Desde 1982 se han emprendido varios esfuerzos para controlar la reproducción en cautiverio y poder obtener una producción satisfactoria de larvas. Dentro de los aspectos que han impedido este objetivo se encuentran su corta temporada reproductiva, restringida a una sola semana en el año, la edad promedio de los reproductores, estimada en 15 años, la imposibilidad de canular a las hembras no para determinar su madurez sexual, pero el principal problema es la imposibilidad para distinguir hembras de machos, lo que evita establecer una proporción adecuada para una fertilización óptima. Por otra parte, como consecuencia del rápido crecimiento de las larvas, el suministro de una densidad adecuada de presas vivas resulta difícil, lo que ha provocado que las larvas sean liberadas en etapas tempranas, con menos probabilidades de sobrevivencia, para evitar el canibalismo. Dentro de este contexto, una parte de esta investigación estuvo dirigida a la determinación de la vitelogenina (VTG), molécula precursora del vitelo y característica de hembras en etapa reproductiva. La vitelogenina plasmática fue aislada y purificada por medio de cromatografía de filtración en gel, precipitación selectiva con EDTA-MgCl₂, y electro-elución. Las moléculas purificadas fueron caracterizadas por su peso molecular y grupos prostéticos. Se generaron anticuerpos policlonales y se obtuvieron IgGs por medio de cromatografía en proteína "A". Con los antígenos y anticuerpos purificados, se llevaron a cabo pruebas de reacción cruzada lo que permitió el reconocimiento de hembras y machos permitiendo el establecimiento de proporciones adecuadas para la reproducción. Se probaron diferentes protocolos hormonales para la inducción de la maduración y el desove, siendo los factores liberadores de gonadotropinas los que dieron mejores resultados. Se desarrolló un ELISA competitivo el cual fue sometido a pruebas de control de calidad. El inmunoensayo fue validado determinando concentraciones de VTG en plasma y mucus de hembras maduras. y evaluando los protocolos hormonales. La cuantificación de VTG por ELISA constituye una alternativa práctica, confiable y rápida para identificar el género de los adultos de catán sin sacrificarlos y puede usarse como un marcador del progreso de la madurez sexual. En otra parte de la investigación se establecieron las mejores condiciones para el cultivo de larvas y juveniles y se definió una estrategia de alimentación para alcanzar un crecimiento óptimo. Finalmente, por medio de la captura de juveniles silvestres y juveniles cultivados se estableció un nuevo lote de reproductores.

ABSTRACT

Alligator gar (*Atractosteus spatula*) is the largest freshwater fish inhabiting rivers draining into the Gulf of Mexico. These fishes have traditionally been harvested in the northeast region of Mexico, where they are highly appreciated for their size and the quality of their meat. As a consequence of commercial and sport overfishing, gar populations have drastically declined. Additionally, harvest occurs during their natural reproductive season, thus affecting the recruitment of juveniles. Spawning grounds have also been damaged by urban and agricultural expansion and the construction of dams. Since 1982 several efforts have been made to accomplish their reproduction in captivity to overcome the limited supply of larvae. Several aspects have hindered the successful reproduction of adult alligator gar, such as their short natural reproductive season, restricted to only a week per year, the mean age of the breeders, estimated in 15 years, the fact that females cannot be cannulated to determine their sexual maturity and first and foremost because of the impossibility to distinguish males from females, which prevents the establishment of an adequate sex proportion required for optimal fertilization. Furthermore, as a consequence of the high growth rate of larvae, maintaining adequate live prey density to prevent cannibalism is difficult. Therefore, larvae have been released at young ages to prevent cannibalism due to high culture densities. Release of smaller, younger larvae rather than larger, older larvae results in reduced survival. Within this context, a part of this research was aimed to the determination of vitellogenin, which is the precursor of yolk and thus specific of females in reproductive stage. Plasmatic vitellogenin (VTG) was isolated and purified by means of three sequential steps including gel filtration chromatography, selective EDTA-MgCl₂ precipitation, and electroelution. The purified molecules were characterized by their molecular weight and their prosthetic groups. Polyclonal antibodies were raised in rabbits using the purified molecules and IgG's were obtained by Protein "A" chromatography. With both purified antibodies and antigens, cross reaction tests were performed which allowed the straightforward separation of males from females to establish the adequate proportions for reproduction. Different hormonal protocols were used to induce maturation and spawning. Among the hormones used gonadotropin releasing factors showed the best results. A competitive ELISA was developed and submitted to a set of control quality tests. The immunoassay was validated by measuring VTG concentrations in plasma and mucus of gar females. Furthermore, the ELISA was used to evaluate hormonal protocols. Quantification of VTG by ELISA constitutes a practical, reliable and quick alternative to identify the gender of alligator gar adults without their sacrifice and can be used as a definitive marker for the onset and progress of maturation in female alligator gar. In another part of this research the best culture conditions for larvae and juveniles were established and a feeding strategy to achieve best growth was defined. Finally, from wild captured and captive reared juveniles a new broodstock was formed. This research provides a basis for mass production of larvae for repopulation experiments and for the culture of commercial-size alligator gar

INTRODUCCION

El catán (*Atractosteus spatula*) es la especie dulceacuícola de mayor tamaño que hábita en las aguas continentales de México. En nuestro país su localización se restringe a la vertiente del Golfo de México, y se le encuentra específicamente en el estado de Tamaulipas, en donde es apreciado por la calidad de su carne, y por su tamaño. En los estados de Tamaulipas y Nuevo León cuentan con un mercado bien establecido, además estos peces también son objeto de pesca deportiva, ya que su tamaño los convierte en un atractivo trofeo (pueden alcanzar hasta 2 metros de largo). Sin embargo, en la actualidad no existen normas que regulen su captura, lo cual ha provocado una explotación desmedida. Esto, aunado a las alteraciones de su hábitat, ha hecho que los volúmenes de su captura decrezcan. Esta disminución en los niveles poblacionales actualmente implica no solo la privación de un recurso tradicional para los pescadores y comerciantes de la región Noreste, sino también el riesgo de que la especie se extinga. A este respecto desde hace varios años se viene argumentando que de no protegerse permanentemente se corre el riesgo de desaparecer de la zona. Así mismo se ha señalado la necesidad de establecer zonas reservadas para la conservación de la especie, dándole oportunidad para que se reproduzca. Esta situación no es exclusiva de nuestro país, ya que en diversas regiones de Norte América se ha propuesto que esta especie sea considerada como amenazada o en peligro.

Considerando el valor faunístico de esta especie, por ser endémica y por la situación actual de sus poblaciones que tienden a desaparecer, su valor científico, por tratarse de organismos pancrónicos y sus posibilidades de explotación comercial, se plantea un problema de índole científico, social y económico, cuya solución requiere de una base teórica que sirva como punto de partida en la elaboración de medidas eficaces para su

conservación y aprovechamiento, como lo sugieren León *et al.*, (1978). Esta solución radica en el desarrollo de técnicas dirigidas hacia el control de la reproducción en cautiverio, como una medida para incrementar las poblaciones de juveniles y de esta manera recuperar las poblaciones amenazadas.

Hasta el momento, este problema ha sido abordado esencialmente por la vía de la zootecnia, restringiéndose a la definición de condiciones ambientales y no se ha ejercido ningún otro tipo de control sobre su reproducción. A nivel nacional únicamente se cuenta con 30 adultos mantenidos en cautiverio en el Centro Acuícola Tancol de la SAGARPA, en las inmediaciones de Tampico, Tamaulipas. Estos organismos se reproducen y desovan de manera natural solo durante una semana en el año, lo que limita enormemente la producción de crías necesarias para restaurar los niveles poblacionales de la especie. Debido a la afectación de las existencias del catán, y tomando en cuenta que los escasos ejemplares adultos existentes (inventariados) son considerados como un Patrimonio de la Nación, resulta difícil realizar estudios directos con estos organismos, de ahí la necesidad de establecer un lote de reproductores con juveniles silvestres. Igualmente, se requiere de un modelo lo más cercano posible a esta especie, que permita experimentar diversas técnicas de inducción a la maduración sexual, como una alternativa para incrementar la producción de crías, al menos en dos estaciones del año. Dentro de este contexto, en el presente se cuenta con la colaboración del personal de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (U.J.A.T.), misma que proporcionará ejemplares adultos de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) para realizar los estudios de base y de esta manera tomar los resultados como referencia para su aplicación en ejemplares de catán (*Atractosteus spatula*).

JUSTIFICACION E IMPORTANCIA

Hasta el momento, los trabajos que se han realizado en relación a la reproducción de esta especie son incipientes ya que se han limitado únicamente al mantenimiento de reproductores en cautiverio. Para que la reproducción sexual y, en particular, la fertilización de los gametos se lleven a cabo de manera exitosa en esta especie, es imperativo mantener una proporción sexual adecuada. Sin embargo, uno de los obstáculos para lograrlo es la ausencia de un dimorfismo sexual definido. Una alternativa práctica para facilitar el sexado de los organismos y estimar su grado de madurez sexual, como respuesta a las inducciones hormonales, se encuentra en la utilización de marcadores bioquímicos. Un ejemplo es la vitelogenina y vitelina, moléculas específicas de las hembras, cuya concentración aumenta con la recrudescencia gonadal, por lo que en otras especies se ha utilizado, desde hace varios años, como indicador de la madurez sexual. El aislamiento y purificación de la vitelogenina plasmática y vitelina ovárica, así como en la implementación de un inmunoensayo para cuantificar los niveles de estas moléculas significa no solo contar con un índice bioquímico confiable, rápido y no invasivo (no hay necesidad de recurrir al sacrificio de los ejemplares) para estimar el grado de madurez sexual, sino también con un método de sexado preciso. Por otra parte, actualmente la temporada de reproducción natural se restringe a una sola semana en el año, lo cual evidentemente representa un cuello de botella para la obtención de crías, por lo que resulta necesario extenderla. Considerando la dificultad para llevar a manipular los parámetros ambientales en el caso de esta especie (tamaño de los individuos e instalaciones) se pretende ejercer un mayor control sobre la reproducción por medio de la vía endócrina, seleccionando los mejores protocolos

hormonales para la inducción de los reproductores. Finalmente, con las bases fisiológicas adquiridas en experimentos previos es indispensable determinar las condiciones de cultivo de larvas y crías, así como definir una estrategia de alimentación para los juveniles de catán.

En resumen la relevancia de este trabajo radica en que los resultados de esta investigación podrán ser aplicados en los programas de reproducción y cultivo larvario del catán *Atractosteus spatula*, con el objetivo de incrementar los volúmenes anuales de producción de individuos de esta especie, mismos que podrán ser destinados a programas de restauración de poblaciones silvestres, ser mantenidos 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.

HIPOTESIS

La utilización de marcadores bioquímicos y el empleo de hormonas heterólogas permitirán un mejor control de la reproducción del catán.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar métodos eficaces para controlar la reproducción de adultos de catán (*Astratcosteus spatula*), como una alternativa para incrementar la producción de crías y juveniles, al menos en dos estaciones del año.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1-** Desarrollar un método práctico para llevar a cabo el sexado de los adultos.
- 2-** Seleccionar los mejores protocolos de inducción de la madurez sexual para la especie.
- 3-** Desarrollar un inmunoensayo para la evaluación de la madurez sexual.
- 4-** Implementar una metodología para el cultivo de crías y juveniles
- 5-** Formar un nuevo lote de reproductores.

CAPITULO 1

IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN LEPISOSTEIDOS

INTRODUCCION

En acuicultura, la identificación del sexo es uno de los primeros y más importantes pasos para el establecimiento de un cultivo intensivo. Con este fin se han desarrollado técnicas basadas principalmente en la evaluación del dimorfismo sexual de las especies de interés, lo cual requiere de la observación de las características distintivas de forma, color o aparición de ciertas estructuras en el cuerpo (Kucharczyk *et al.*, 1998). Sin embargo, dichas técnicas de identificación presentan ciertos inconvenientes, ya que la aparición de estos caracteres puede estar condicionada a la temporada reproductiva, al desove o bien no presentarse en ningún momento. Lo anterior implica que la identificación del sexo tenga ciertas limitaciones o simplemente no pueda realizarse con facilidad, causando dificultades en el manejo de los lotes de reproductores. En este sentido y como una alternativa para este problema se ha considerado 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 los gametos (Alvarez-Lajonchere *et al.*, 2001). Entre estas técnicas invasivas se pueden mencionar: la canulación, la punción ovárica y la cirugía. La primera consiste en introducir un tubo de calibre adecuado a través del poro genital del espécimen y conducirlo a través de los conductos hasta la gónada para extraer una muestra de 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. Por último 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. En cuanto a las desventajas que presentan estas técnicas, se pueden mencionar el estrés excesivo y trauma ocasionados por la manipulación, además de 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 entre 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 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); proteínas del moco (Chang *et al.*, 1996), así como la presencia o ausencia de Vitelogenina para identificar a hembras y machos; además de la concentración de la misma 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).

Con relación a la Vitelogenina, se han utilizado diversas técnicas para su caracterización y purificación, entre las cuales se destacan la ultracentrifugación, la cual permite separar las

lipoproteínas del resto de las proteínas, en base a su menor densidad; la cromatografía de exclusión molecular, utilizada para aislar las lipoproteínas previamente separadas, en base a su masa molecular; La cromatografía de intercambio iónico, que permite separar aquellas lipoproteínas con rango de peso molecular similar, por medio de su carga iónica; La electroforesis (PAGE), con la cual es posible separar e identificar las moléculas aisladas en base a su masa molecular y/o carga iónica; La técnica de Western-Blot, utilizada para la identificación de las proteínas y péptidos, separados previamente por PAGE; Por otra parte, las técnicas de ELISA y Rocket-Immunolectroforesis han sido comúnmente empleadas para llevar a cabo la evaluación cuantitativa de la Vitelogenina.

Algunas combinaciones de estas técnicas han sido utilizadas con éxito para purificar la Vitelogenina de varias especies de peces marinos y dulceacuícolas (Hori, *et al.* 1979; Campbell y Idler, 1980; Sumpter, 1982; Norberg y Haux, 1985; Hamazakí, *et al.* 1987; Tyler y Lancaster, 1993; Naglef, *et al.* 1994; Nuñez, *et al.* 1996).

ANTECEDENTES

Dimorfismo Sexual en Lepisosteidos

Se presenta un crecimiento diferencial entre machos y hembras, el cual se vuelve menos marcado con la edad, aunque no termina con la madurez. Los machos no solo maduran a una menor talla que las hembras, sino que crecen menos que estas. Esto se confirma en diferentes reportes concernientes al dimorfismo sexual de otros lepisosteidos (*L. platostomus*, *L. oculatus* y *L. platyrinchus*) (Suttkus, 1963).

Se ha reportado la presencia de dimorfismo en ciertas estructuras, e.g. en el tamaño del hocico en *L. oculatus* y *L. platyrinchus*, en ambos casos se ha observado que la hembras

poseen un hocico más alargado que los machos (Suttkus, 1963; Hubbs y Lagler, 1942 citado por Leon *et al.*, 1978). De la misma manera, en el caso del manjuari (*A. tristoechus*) se encontraron diferencias significativas en la relación de algunas medidas anatómicas entre hembras y machos. Las hembras lucen un vientre muy inflamado debido al crecimiento de las gónadas e igualmente presentan una papila genital más inflamada y más coloreada que en el macho (Leon *et al.*, 1978). Este parece ser igualmente el caso del pejelagarto (G. Márquez comunicación personal). A este respecto, Bejerano *et al.* (1997) señalan que las diferencias se acentúan cuando los organismos llegan a un estadio avanzado de maduración.

No obstante, al tratarse de peces inmaduros, éstos resultan muy difíciles de sexar. Es necesario que las gónadas se encuentren algo desarrolladas, ya que el mayor tamaño y forma oval de los ovarios permite diferenciar a las hembras de los machos (Netch y Witt, 1962). Sin embargo, en el caso de diferentes especies de lepisosteidos, esto solo es posible después de varios años. A título de ejemplo se indica que los machos de *L. osseus* maduran entre los 3 y 4 años, mientras que las hembras maduran solo después de los 6 años (Netch y Witt, *op cit.*). El mismo problema se presenta en el caso de del catán (*A. spatula*) (Morales, 1987). Y aún en lepisosteidos que maduran relativamente rápido como es el caso de *A. tropicus* se tiene cierta dificultad para encontrar diferencias entre hembras y machos (Chávez-Lomelí, 1980). Para tratar de solventar este obstáculo se han propuesto modelos alométricos como una herramienta para el sexado de *A. tropicus* (Contreras y Marañón, 1991 citado por Pérez-Sánchez, 1995).

La situación se torna más difícil aún cuando se trata de evaluar el grado de madurez sexual de las hembras (Bejerano *et al.*, 1997), ya que por el momento no se dispone de métodos rápidos y precisos.

Anatomía Interna

En ambos sexos las gónadas se encuentran localizadas en la región posterior de la cavidad abdominal, en posición dorsal con respecto a la vejiga natatoria, suspendidas por un mesorquio (Pérez-Sánchez y Páramo, 1998). Las hembras presentan una particularidad: las gónadas se encuentran desfasadas, i.e., la derecha se encuentra situada de manera anterior a las aletas pélvicas y la izquierda en situación posterior a éstas. Los oviductos izquierdo y derecho se reúnen en los ductos urinarios correspondientes. Existe una pequeña cámara común formada por la unión de ambos ductos. De esta manera los productos de ambos sistemas salen a través de un sinus urogenital único (Suttkus, 1963).

Los ovarios son pequeños y translucidos en estadíos tempranos, pero al avanzar la maduración se van haciendo fusiformes y su color va ir cambiando de acuerdo a la fase de desarrollo en que se encuentren. Los ovarios de hembras jóvenes adquieren una coloración rosa-amarillento correspondiente al color de los ovocitos, al ir madurando, en las etapas avanzadas, va a predominar el color verde olivo o verde grisáceo (Resendez, y Salvadores, 1983; Pérez-Sánchez, 1995). Así, en las hembras, justo antes del desove son evidentes huevos de color verde (Netch y Witt, 1962). Los ovocitos maduros tienen un diámetro aproximado de 3mm y están cubiertos de una sustancia adhesiva.

El examen de los ovarios indica que la maduración se desarrolla de manera sincrónica en todas las regiones del ovario (Bejerano *et al.*, 1997). Sin embargo, como sucede con el esturión, una gran proporción de los huevos no se encuentran maduros (Dean, 1895). El ovario izquierdo es más grande que el derecho, por consiguiente contiene un mayor número de huevos. (Netch y Witt, 1962).

Los testículos de los machos son blancuzcos y de menor tamaño que los ovarios. Son de tipo lobular, y la espermatogénesis ocurre igualmente de manera sincrónica. La forma de los testículos no varía con la maduración, varían únicamente el tamaño y el color, siendo pequeños, amarillos y translucidos cuando están inmaduros y grandes, blancos y de apariencia cremosa cuando están completamente maduros (Pérez-Sánchez y Páramo, 1998).

Estructura del ovario

Los ovarios de los peces poseen un epitelio germinal que se origina a partir de repliegues peritoneales, dando lugar a los folículos ováricos (Benítez, 1992). por debajo de estos se encuentra la túnica albugínea que es una capa muy densa de tejido conectivo con músculos de fibra lisa y vasos sanguíneos. El tejido conjuntivo se incrementa alrededor de los vasos sanguíneos, condición que se mantiene a lo largo de la recrudescencia gonadal (Pérez y Páramo, 1998). Dentro de la estructura del ovario, inmersas en la pared conjuntiva de los repliegues peritoneales se encuentran las ovogonias, destinadas a convertirse en ovocitos a lo largo de la vida productiva de la hembra. (Zanuy y Carrillo, 1987; Benítez, 1992), éstas forman el estroma ovárico, el cual contiene vasos sanguíneos y células somáticas (las foliculares y tecaes) involucradas en el desarrollo del ovocito. La primera transformación se logra una vez que las ovogonias entran en la profase de la primera división meiótica, convirtiéndose así en ovocitos primarios (Zanuy y Carrillo, op.cit.). Los ovocitos posteriormente serán envueltos por células foliculares, constituyendo de esta manera la unidad estructural conocida como folículo. (Benítez, 1992).

En el caso particular de los lepisosteidos las gónadas de las hembras se encuentran desfasadas: la derecha se sitúa de manera anterior a las aletas pélvicas, mientras que la

izquierda se localiza de manera posterior a estas (Suttkus, 1963). Durante los primeros estadios los ovarios tienen una apariencia de órganos huecos, generalmente redondeados, pequeños y translucidos, pero a medida que avanza la maduración se tornan fusiformes y adoptan una coloración característica de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encuentren. Así, los ovarios de los ejemplares púberes adquieren una coloración amarillorosa, mientras que en las etapas más avanzadas de maduración predomina el color verde olivo o verde grisáceo (Netch and Witt, 1962; Resendez y Salvadores, 1983; Pérez-Sánchez, 1995). Por otra parte, Pérez y Páramo (1998) señalan que en las hembras de pejelagarto (*A. tropicus*), una especie cercana al cátan, los ovarios se encuentran cubiertos por un mesovario, el cual se extiende de tal manera que forma un solo conducto gonádico que une a ambos ovarios, mediante largos oviductos que se localizan en la parte media de la gónada.

Vitelogénesis

Se ha demostrado que en los ovarios se realiza la síntesis de corticosteroides, progestágenos importantes para la maduración de los ovocitos ($17\alpha 20\beta$ -diOHP), andrógenos (precursores de los estrógenos trans aromatización) y estrógenos esenciales para la vitelogénesis (17β -estradiol) (Verreth, *et al.*, 1987; Mommsen and Walsh, 1988). Ésta última se refiere a la síntesis de vitelo y su incorporación dentro de los ovocitos, considerándose como uno de los mejores ejemplos de la especialización celular por endocitosis de proteínas específicas (Rodríguez, *et al.*, 1996). Si esta síntesis llega a ocurrir dentro del ovocito se le conoce como vitelogénesis endógena y si ocurre fuera se le denomina vitelogénesis exógena. En general, se considera que la vitelogénesis endógena

precede a la exógena. Sin embargo, muchas veces, dichas fases se superponen entre sí (Verreth, *et al.*, 1987; Zanuy y Carrillo, 1987).

La vitelogénesis endógena parece estar asociada a la síntesis de las vesículas de vitelo, las cuales, en general, poseen mucopolisacáridos o glicoproteínas. Estas vesículas son las precursoras de los alvéolos corticales, estructuras que liberan su contenido en el espacio perivitelino en el momento de la fecundación del ovocito, como mecanismo para evitar la polispermia. Algunos autores consideran que la síntesis de lípidos puede ser también de carácter endógeno (Nagahama, 1983). Al término de esta síntesis, se observa la zona radiata con una apariencia estriada y se genera el desarrollo de la granulosa y la teca, al igual que la presencia de los gránulos vitelínicos.

Por otra parte, la incorporación del vitelo exógeno o vitelogénesis exógena, es la que realmente contribuye al importante crecimiento del ovocito y se encuentra bajo control hipofisiario. Durante esta etapa, se presenta una proliferación del Retículo Endoplasmático Rugoso en la granulosa y la teca, el aparato de Golgi se observa mucho más extenso con inclusiones electro-densas, en el citoplasma se disipan gránulos de glucógeno y gotas de lípidos, y el núcleo y nucleolo aparecen hipertrofiados. El ovocito empieza a secuestrar por micropinocitosis el material necesario para la formación de los gránulos de vitelo, los cuales, a medida que van migrando hacia el interior del ovoplasma, desplazan a las vesículas hacia la periferia (Ng y Idler, 1983; Benítez, 1992). El final de este proceso, está caracterizado por la migración y ruptura de la vesícula germinativa, proceso que tiene lugar antes de la ovulación.

Con estos eventos finaliza la vitelogénesis y se aproxima la maduración, donde los ovocitos postvitelogenéticos, aún en profase-I, no son fertilizables hasta completar la meiosis. La meiosis se vuelve a bloquear en metafase-II, después sucede la ovulación y la expulsión

del primer glóbulo polar se produce de manera simultánea con la fertilización.

Síntesis de Vitelogenina

La vitelogenina (VTG), es el principal precursor macromolecular de los constituyentes del vitelo, destinado a satisfacer las necesidades energéticas del embrión. Se trata de una proteína exclusivamente femenina que circula a nivel plasmático al inicio del crecimiento ovocitario (Copeland y Thomas, 1988; Norberg y Haux, 1988; Kanungo *et al.*, 1990; Mañanós *et al.*, 1994, Specker y Sulliang, 1994; Lancaster y Tyler, 1994; Lafleur, *et al.*, 1995)

La síntesis de la vitelogenina es estimulada por el aumento de los niveles de estrógenos provenientes de las células foliculares. Estos esteroides se dirigen al hígado, en donde después de entrar en contacto con receptores citoplasmáticos flanquean la barrera nuclear para unirse con el elemento de respuesta hormonal (HRE-hormone response element) localizado en el DNA, lo que permitirá el inicio de la transcripción del gen de la VTG por el RER. La molécula es subsecuentemente procesada por el aparato de golgi (Yao y Crim, 1996), en donde es glicosilada como condición para salir al torrente sanguíneo. Por esta vía se dirige al ovario para entrar de manera selectiva al interior del ovocito por vasos capilares localizados en la teca, y alrededor de la capa superior del ovocito (De Vlaming *et al.*, 1980; Copeland y Thomas, 1988; Kanungo *et al.*, 1990; Nuñez y Le, 1996; Rodriguez *et al.*, 1996), mediante un proceso de macropinocitosis mediado por receptores especializados (Ng y Idler, 1983; Zauny y Carrillo, 1987; Mommsen y Walsh, 1988; Lancaster y Tyler, 1994; LaFleur *et al.*, 1995), los cuales la reconocen específicamente uniéndose a la región en donde se encuentra el fósforo como grupo prostético de la molécula de VTG (Mommsen

y Walsh, 1988).

Una vez que la VTG es incorporada en el interior del ovocito se lleva a cabo el clivaje proteolipídico dando como resultado lipovitelinas y fosfovitas (Wiley *et al.*, 1979; Covens, *et al.*, 1986; Riazi y Fremont, 1988; Tyler y Sumpter, 1990; Benítez, 1992; Kishida y Specker, 1994; Komatsu *et al.*, 1996). Los receptores de la VTG se pueden encontrar desde que los ovocitos están en previtelogénesis, y su número se incrementa para facilitar la incorporación de grandes cantidades de esta molécula, necesaria para llevar a cabo el crecimiento de los ovocitos del estado previtelogénico al vitelogénico (Chan, *et al.*, 1991). De aquí, que el control del mecanismo de expresión y modulación de los receptores de la VTG, sea un elemento clave durante el ciclo de vitelogénesis (Callard *et al.*, 1990; Lancaster y Tyler, 1994). Un aspecto de gran interés práctico es el hecho de que el clivaje que sufre la e VTG no altera las propiedades antigénicas de la molécula transformada en VTL. De aquí, que se considere que ambas moléculas sean inmunológicamente indistinguibles.

Características de la VTG

Una de las particularidades de la molécula de VTG es su alto peso molecular, producto de la asociación de las proteínas con lípidos, carbohidratos, fósforo y calcio, originados durante la vitelogénesis, por lo cual ha sido caracterizada como una lipoglicofosfocarotenoproteína propia de hembras en estado reproductivo (Hori *et al.*, 1979; De Vlaming *et al.*, 1980; Ho, 1987; Waagboe y Sandnes, 1988; Riazi y Fremont, 1988; Campbell y Idler, 1990; Tyler y Sumpter, 1990; Matsubara y Sawano, 1995; Nuñez, *et al.*, 1996; Chang, *et al.*, 1996; Komatsu *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 1996).

Se ha determinado, un rango de peso molecular para la VTG que varía entre los 130 y

los 636 kDa, de acuerdo a la especie, como se indica en la Tabla I.

Tabla I. Estimaciones del peso molecular, en diferentes peces

ESPECIE	PESO MOLECULAR DE LA VTG EN KDa	TÉCNICA	AUTOR	AÑO
<i>Salmo gairdneri</i>	440	Cromatografía en filtración en gel, Ultracentrifugación Electroforesis	Norberg y Haux	1985
<i>Cynoscion nebulosus</i>	200	Cromatografía en filtración en gel	Copeland y Thomas	1988
<i>Cyprinus carpio</i>	390	Cromatografía en filtración en gel e Intercambio de iones	Tyler y Sumpter	1990
<i>Dicentrarchus labrax</i>	445	Cromatografía en filtración en gel, Electroforesis	Mañanós, <i>et al.</i> ,	1994
<i>Verasper moseri</i>	520	Cromatografía en filtración en gel	Matsubara y Sawano	1995
<i>Oreochromis mossambicus</i>	130 200	Cromatografía de Intercambio de iones SDS-PAGE	Johanning y Specker	1995
<i>Acanthopagrus shlegeli</i>	636 321	Cromatografía en filtración en gel, Electroforesis	Chang, <i>et al.</i> ,	1996
<i>Macrozoarces americanus</i>	577.8	Cromatografía en filtración en gel	Yao y Crim	1996
<i>Cydopterus limpus</i>	630.5	Cromatografía en filtración en gel	Yao y Crim	1996
<i>Gadus morhua</i>	485.2	Cromatografía en filtración en gel	Yao y Crim	1996
<i>Plectropomus leopardus</i>	350	Cromatografía de filtración en gel	Takemura y Teruya	1997

<i>Sparatus aurata</i>	180	Electroforesis	Moscón, <i>et al.</i> ,	1998
<i>Salvelinus alpinus</i>	158	SDS-PAGE	Johsen, <i>et al.</i> ,	1999
<i>Oryzias latipes</i>	200	SDS-PAGE	Nishi kazuro, <i>et al.</i> ,	2002
<i>Rhombosolea tapirina</i>	540	Cromatografía de filtración en gel	Watts, <i>et al.</i> ,	2003
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	383			
<i>Salmo salar</i>	557			

El material lipídico que forma parte de la VTG, esta compuesto principalmente de fosfolípidos (Mommsen y Idler, 1983), contribuyendo de esta manera al transporte y translocación de la molécula en el sistema circulatorio. Así mismo, esta molécula esta asociada con otros grupos prostéticos tales como los carotenoides, cuyo papel multifuncional implica protección contra la luz, reserva energética y acción antioxidante. El contenido de fósforo, al igual que los carbohidratos es de suma importancia, no sólo por su rol energético, sino también para el reconocimiento de los receptores específicos durante la síntesis de la VTG (Opresko, *et al.*, 1981; Mommsen and Walsh, 1988). Al igual que el peso molecular, esta composición varía dependiendo de las especies (Tabla II), y de la etapa de vitelogenesis en que se encuentra el organismo. De igual manera, la concentración de VTG dependerá de la especie. *Dicentrarchus labrax* y *Acipenser baeri*, son un ejemplo de estas variaciones, ya que ambas especies presentan niveles relativamente elevados de vitelogenina de 3 mg/ml a 100 mg/ml, respectivamente, algunos meses antes del desove. Sin embargo, mientras que estos niveles llegan a disminuir hasta 1 mg/mL en *Dicentrarchus labrax*, durante el desove y unos días posteriores a este, el caso de *Acipenser baeri* solo llegan a descender hasta 10 mg/mL en (Cuissiet *et al.*, 1991; Mañanós, *et al.*,

1994).

Tabla II Composición porcentual de la VTG, en diferentes especies de peces

	PROTEÍNA %	LÍPIDOS %	FÓSFORO %	CARBOHIDRA TOS %
<i>Anguilla japonica</i> Komatsu, et al., 1996	86.0	13.0	----	1.0
<i>Macrozoarces americanus</i> Yao y Crim, 1996	----	18.0	3.6	----
<i>Cyclopterus lumpus</i> Yao y Crim 1996	----	21.18	2.45	----
<i>Gadus murhua</i> Yao y Crim, 1996	----	21.34	2.15	----
<i>Cyprinus carpio</i> Linhartt et al., 1995	17.6 - 27.7	2.2 - 7.3	----	----
<i>Oreochromis mossambicus</i> Specker y Sulivian,	0.1	----	1.7	----

1994				
------	--	--	--	--

Caracterización y Purificación de la VTG

Diversas técnicas de cromatografía y electroforesis se han llevado a cabo de manera frecuente para aislar y separar moléculas, estimar su peso molecular y distinguir diferentes aspectos de su estructura. Así, en estudios recientes se ha purificado y caracterizado la VTG proveniente de ovarios maduros de distintas especies de peces, utilizando diversas técnicas bioquímicas como la cromatografía de intercambio de iones, ultracentrifugación, cromatografía de exclusión molecular, electroforesis en gel de poliacrilamida, agarosa e Inmunoelectroforesis (Tabla III).

Tabla III Técnicas de cromatografías y electroforesis para la purificación de la vitelogenina en diversas especies

ESPECIE	TÉCNICA	RESULTADOS	AUTOR	AÑO
<i>Salmo salar</i>	Cromatografía de Filtración en gel e Intercambio iónico	Purificación y Caracterización de la VTG.	Idler, <i>et al.</i> ,	1979
<i>Salmo gairdneri</i> <i>Salmo trutta</i>	Precipitación Cromatografía de Filtración en gel e Intercambio iónico	Purificación y Caracterización de la VTG	Norberg y Haux	1985

<i>Cynoscion nebulosus</i>	Precipitación Cromatografía de Filtración en gel	Purificación de la VTG	Copeland y Thomas	1988
<i>Cyprinus carpio</i>	Cromatografía de Filtración en gel e Intercambio iónico	Purificación de la VTG	Tyler y Sumpter	1990
<i>Acipenser transmontanus</i>	Electroforesis Cromatografía de Afinidad	Caracterización parcial de la VTG	Bidwell	1991
<i>Oreochromis niloticus</i>	Cromatografía de Intercambio iónico	Purificación de la VTG	Chang, <i>et al.</i> ,	1991
<i>Sebastes taczanowskii</i>	Inmunoelectrofor esis	Purificación y Caracterización de la VTG	Takemura, <i>et al.</i> ,	1991
<i>Raja erinacea</i>	Western Blot	Purificación y Caracterización parcial de la VTG	Pérez y Callard	1993
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Electroforesis Cromatografía de Filtración en gel e Intercambio iónico	Purificación y Caracterización de la VTG	Tyler y Lancaster	1993
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Cromatografía de Filtración en gel e Intercambio iónico	Purificación y Caracterización de la VTG	Mañanós, <i>et al.</i> ,	1994
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Electroforesis	Caracterización de la VTG	Johanning y Specker	1995

<i>Macrozoarces americanus</i> <i>Cyclopterus lumpus</i> <i>Gadus morhua</i>	Ultrafiltración Cromatografía de Filtración en gel e Intercambio iónico	Purificación y Caracterización de la VTG	Yao y Crim	1996
<i>Anguilla japonica</i>	Ultracentrifugación Cromatografía de Intercambio iónico	Purificación de la VTG	Komatsu, <i>et al.</i> ,	1996
<i>Acanthopagrus scheinii</i>	Electroforesis Cromatografía	Purificación y Caracterización de la VTG	Chang, <i>et al.</i> ,	1996
<i>Plectropomus leopardus</i>	Cromatografía de Filtración en gel	Purificación y Caracterización de la VTG	Takemura y Teruga	1997

METODOLOGÍA

Obtención del material biológico

La vitelogenina fue purificada a partir de muestras de sangre de ejemplares macho de pejelagarto (*A. tropicus*), mantenidos en el laboratorio de acuicultura de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en los cuales se indujo la síntesis de la misma mediante inyecciones intraperitoneales de 17 β Estradiol (E₂)(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 E₂ 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.

La purificación de la vitelina se realizó con ejemplares adultos de *Atractosteus spatula*, los cuales fueron proporcionados por el “*Centro Acuícola Tancol*” (SAGARPA), ubicado en el poblado de Tancol, en Tampico, Tamaulipas. Los organismos fueron disectados y los ovarios obtenidos se fraccionaron y se mantuvieron en congelación a -30°C. Muestras de gónada (1 gr.) se homogenizaron en un Potter, con un buffer TRIS-HCl 50mM pH 7.2 en frío (4 ml.) conteniendo Fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF 5mM, inhibidor de proteasas). Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 4,000 r.p.m. durante 30 min. a 4°C, para eliminar los residuos sólidos y el material graso. El sobrenadante fue utilizado para la purificación.

Purificación de VTG Plasmática y VTL Ovarica

Las muestras de plasma con VTG y de extractos de gónada con VTL fueron inicialmente sometidos 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 centrifugo a 2500 x g durante 35 minutos a 4° C. Se elimino 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 ó VTL se realizó por cromatografía líquida de filtración en gel de Sepharose 6B ó 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 equilibrio 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 y VTL purificada respectivamente.

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 μ g 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 μ g 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 empleó 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.

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 Freund 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 (Pharmacia) 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 congelo a -20° C para su posterior uso.

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.

Sexado de organismos

Tres lotes de organismos fueron utilizados para realizar las pruebas de sexado. El primer lote consistió de 39 adultos de catán mantenidos en las instalaciones del Centro Acuícola Tancol. Para el segundo grupo se consideraron 75 juveniles de catán capturados en la Laguna de Tamiahua y mantenidos en un estaque rustico perteneciente a la Secundaria Técnica Pesquera No. 21 en San Gregorio, Ozuluama, Veracruz (La Laja). Finalmente el tercer grupo consistió de un lote de 28 juveniles silvestres de catán capturados en la Presa Vicente Guerrero y transportados a las instalaciones de la granja Desarrollo Acuícola "El Huasteco", ubicado en el municipio de Gómez Farías, Tamaulipas.

Muestras de sangre de los organismos capturados y en cautiverio fueron obtenidas mediante una punción caudal, con la ayuda de vacutainer. Posteriormente, las muestras se colectaron en tubos heparinizados conteniendo 1% de PMSF, en seguida fueron centrifugadas a 5,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C y el plasma obtenido se conservó en tubos Eppendorf a una temperatura de -30°C. Estas muestras fueron colectadas para llevar a cabo el Sexado de los organismos.

El Sexado de los organismos se realizó mediante la técnica de electroforesis y pruebas cruzadas, utilizando un anticuerpo anti-VTG para *Atractosteus tropicus*. Esta última prueba consistió en preparar placas de agarosa de baja electroendosmosis al 1%, con 0.3g de agarosa y 30 ml de TRIS (10mM, pH 7.3). El gel se disolvió a alta temperatura para ser vertido en una placa de acrílico de forma cuadrangular. Una vez secos los geles se hicieron una serie de pozos en los cuales fueron incluidas diferentes diluciones del plasma. La placa fue incubada en una cámara húmeda durante 24 horas. Posteriormente se lavó en una solución salina al 14% durante 14 horas con el fin de retirar las proteínas que no precipitaron. Después de esto, las placas fueron prensadas durante 17 horas y finalmente se colorearon con Azul de Coomassie R250 durante 2 horas y se decoloraron con una mezcla

de 40% de alcohol etílico, 10% de ácido acético glacial y 50% de agua destilada (Laine, 1992) .

RESULTADOS:

Purificación de la Vitelogenina.

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 17 β 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 y ausente en los no tratados. Esta misma banda proteica se mantuvo después del proceso de la precipitación selectiva de vitelogenina y de la filtración en Sepahrose 6B con lo cual se confirmó preliminarmente que se trataba de proteínas inducidas por el 17 β Estradiol (Fig.1).

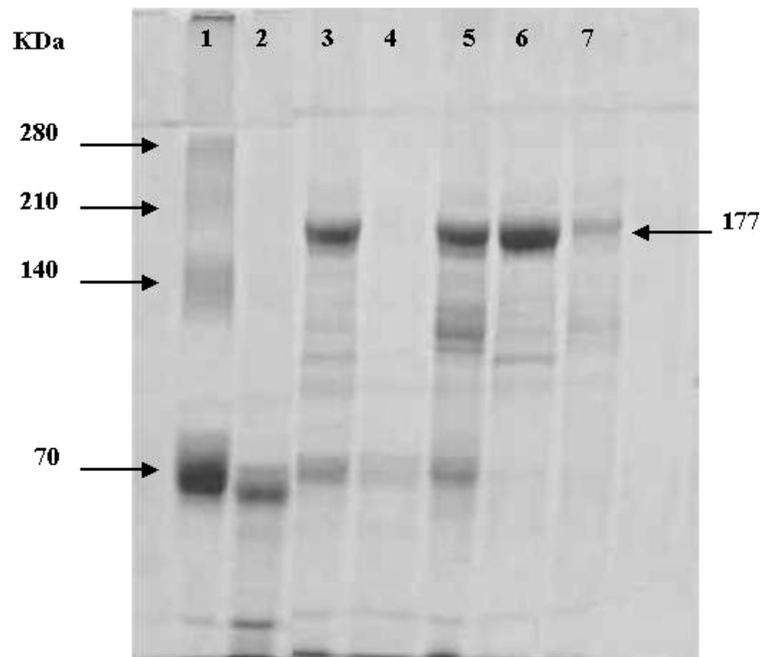


Figura 1. Plasma de ejemplares no tratados (2 y 4); tratados con estradiol (3 y 5), precipitado de VTG (6); fracción de Sepharosa 6B (7) y marcador de peso molecular Hemocianina (1).

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) e intercambio de iones en DEAE Sephacel. 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.

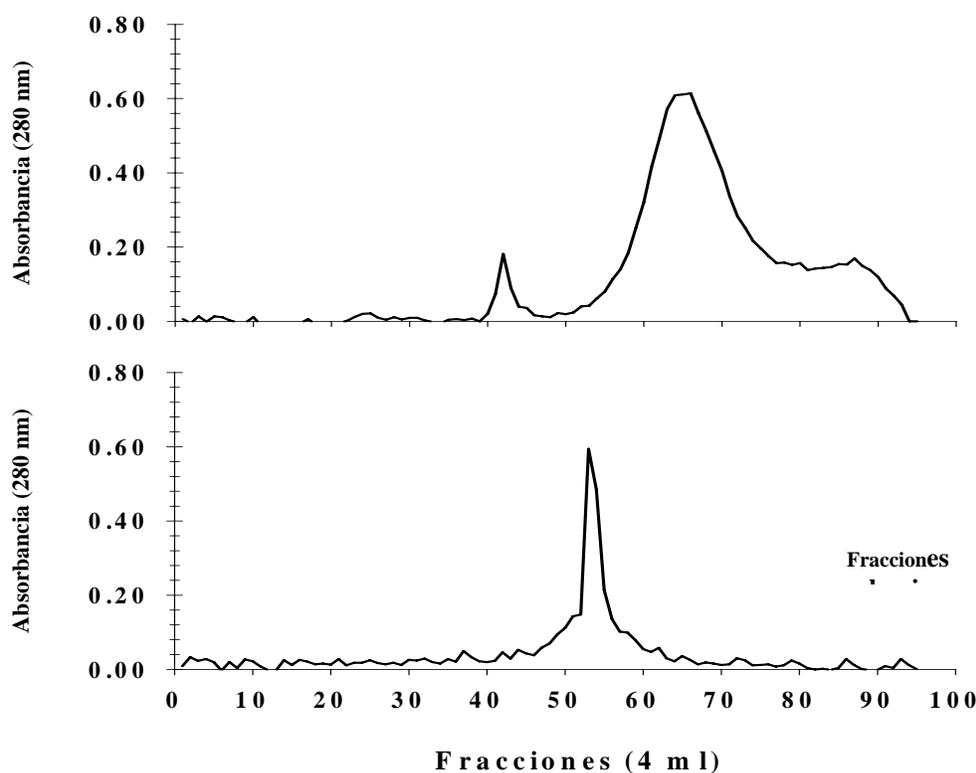


Figura 2. Perfil de las fracciones cromatográficas de filtración en gel de Sepharosa 6B de plasma de macho de *A. tropicus* tratados con 17β Estradiol: sin precipitar (normal) (a); y precipitado con EDTA-MgCl (b) eluido con buffer Tris HCl 50 mM pH 8, 1% NaCl, 1 mM de MgCl, 1 mM PMSF.

Selección y Antigenicidad de Anticuerpos

Las pruebas cruzadas preeliminares 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. 3).

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.

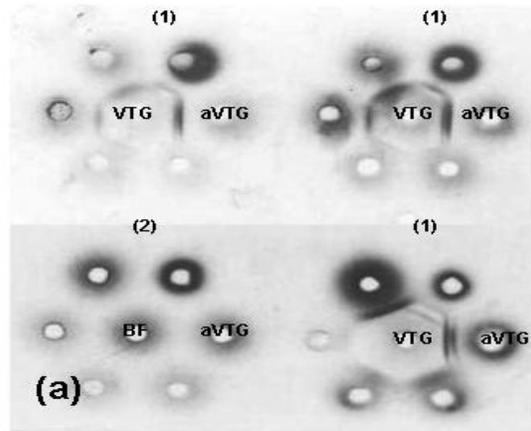


Figura 3. Pruebas cruzadas entre la VTG purificada y el suero anti-VTG obtenido en conejos, donde se muestran las líneas de precipitación de la reacción de reconocimiento del antígeno (1) y la ausencia de la misma en el testigo negativo (2). VTG: proteína purificada, anti-VTG: anticuerpo, BF: Buffer.

Purificación de la VTL

La filtración en gel, permitió separar la muestra proteica en dos picos principales detectados a 280 nm (Figura 4). Ambos picos proteicos fueron sometidos a la técnica de Pruebas Cruzadas, utilizando anticuerpo anti-VTG de *Atractosteus tropicus*, con lo cual se determino que la fracción 47, es la que correspondía a la molécula de la lipovitelina ovárica (Figura 5).

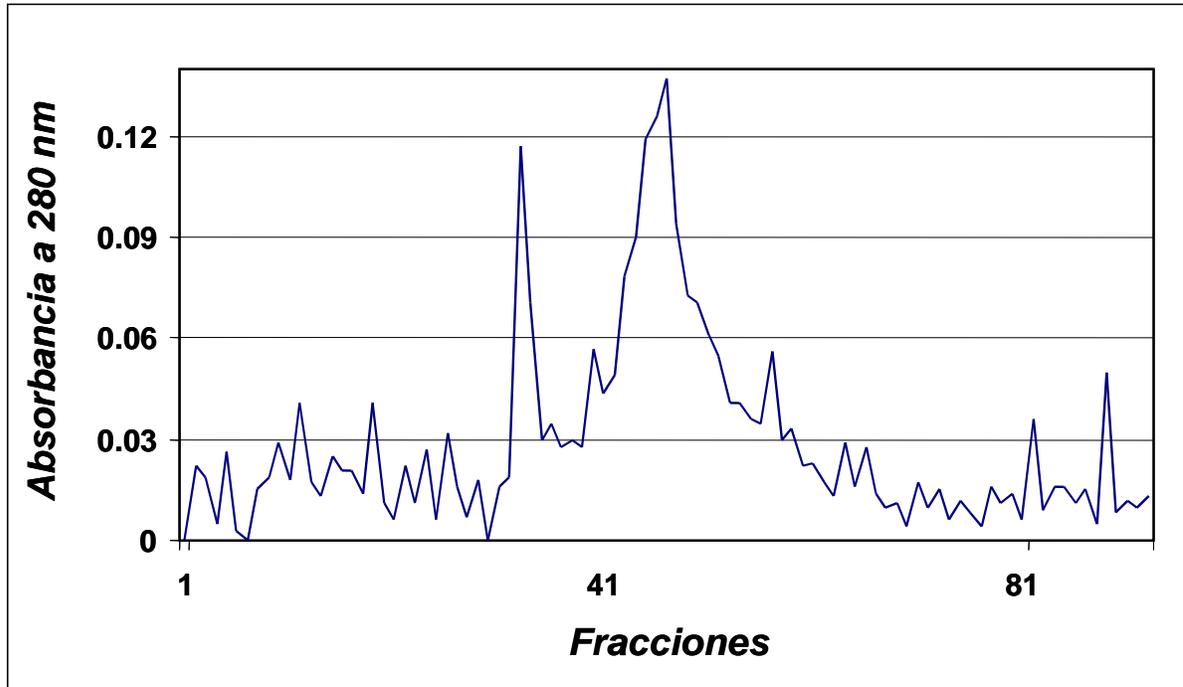


Figura 4.- Fracciones proteicas del extracto de ovario maduro precipitado a 280 nm, en Sephacryl-300

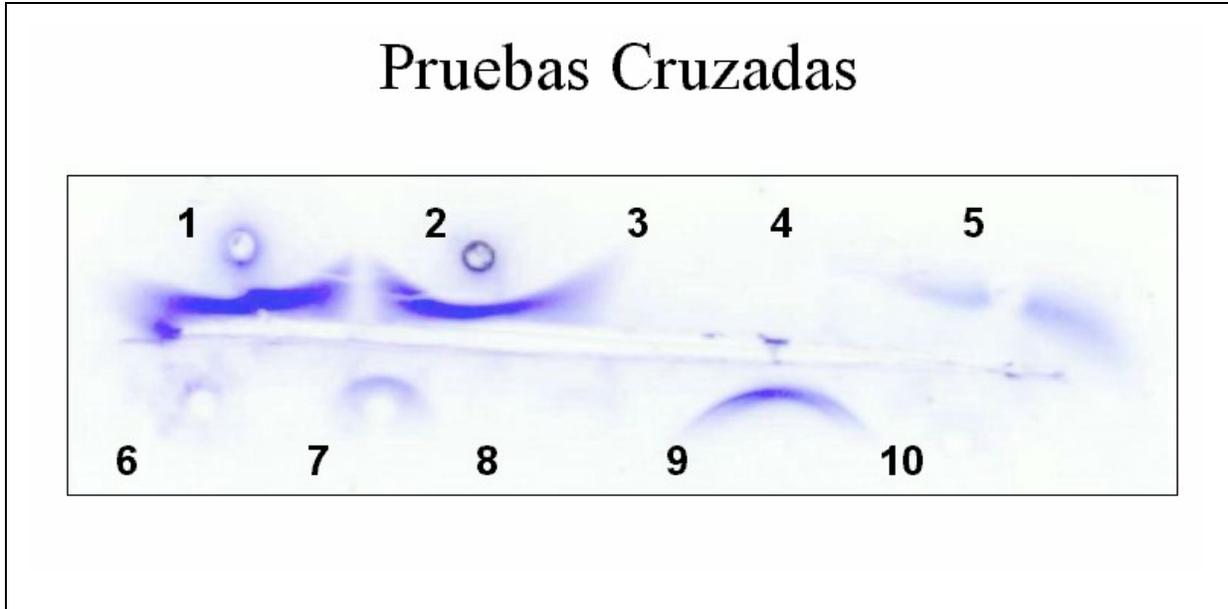


Figura 5.- Pruebas Cruzadas de extracto de ovario maduro de *Atractosteus spatula* (2), extracto de ovario maduro de *A. tropicus* (1), fracciones proteicas en Sepharosa- 6B (3,4,5), fracción 47 en Sephacryl-300 (7), fracción 8 en DEAE-Sephacel (9).

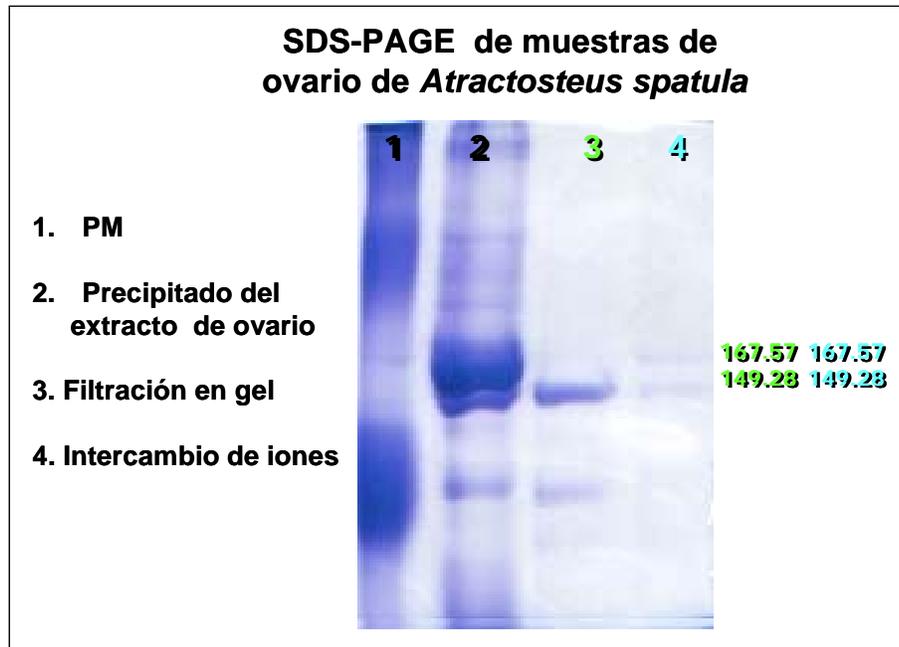


Figura 6.- Determinación del peso molecular (miles de daltons) de la VTL, en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes. Kit del peso molecular (1), Precipitado del extracto de ovario maduro de *Atractosteus spatula* (2), Fracción 47 de Sephacryl (3), Fracción 8 de DEAE-Sephacel (4).

Las fracciones obtenidas en filtración por Sephacryl-300 e Intercambio de iones (DEAE-Sephacel) fueron sometidas a electroforesis, lo cual nos permitió observar un patrón similar al obtenido en cromatografía (Figura 6).

SEXADO DE ORGANISMOS:

a) Centro Acuícola Tancol

En un intento por sexar a los organismos por sus características morfológicas se tomaron encuentra el peso y longitud, no encontrándose diferencias significativas ni para el peso (F: 3.94, P:0.0017, gl: 13) y para la longitud (F: 0.657, P: 0.217, gl: 13) (Figura 7).

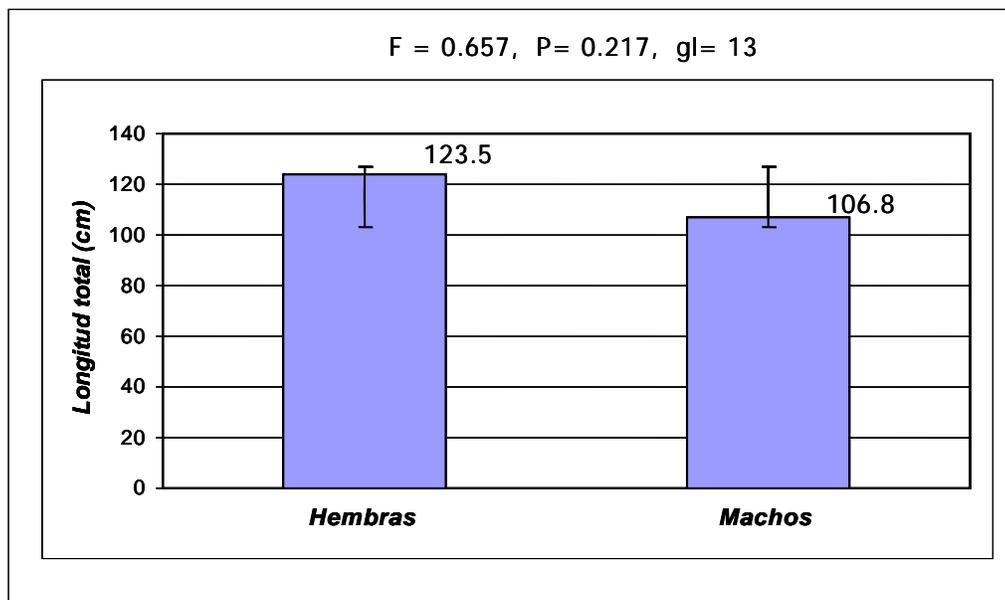
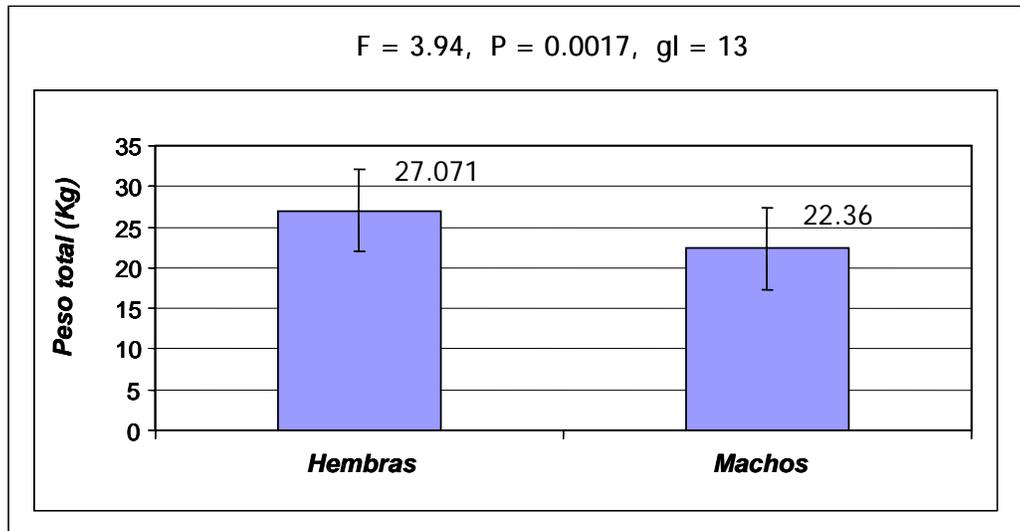


Figura 7.- Valores promedio del peso (kg) y longitud (cm) de *Atractosteus spatula*.

Sin embargo, mediante pruebas cruzadas (Fig 8) y técnicas de electroforesis (Fig 9), fue posible determinar el sexo de los 39 organismos del Centro Acuícola Tancol, de los cuales 25 organismos resultaron machos y 14 hembras, siendo estas últimas las siguientes: 3, 4, 6, 12, 13, 16, 22, 25, 28, 29, 30, 35, 37 y 39

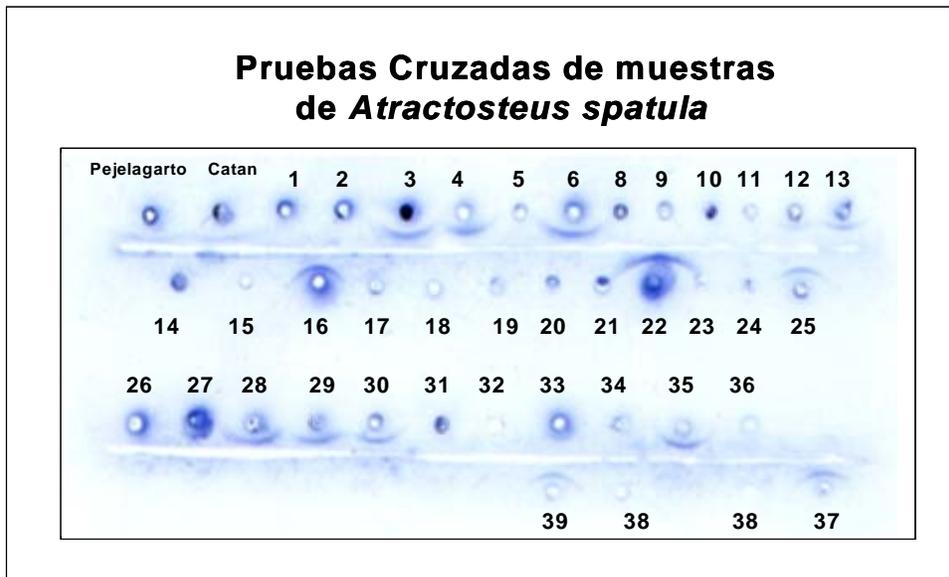


Figura 8.- Sexado del lote de reproductores del Centro acuícola de Tancol *Atractosteus spatula*, mediante la técnica de pruebas cruzadas.

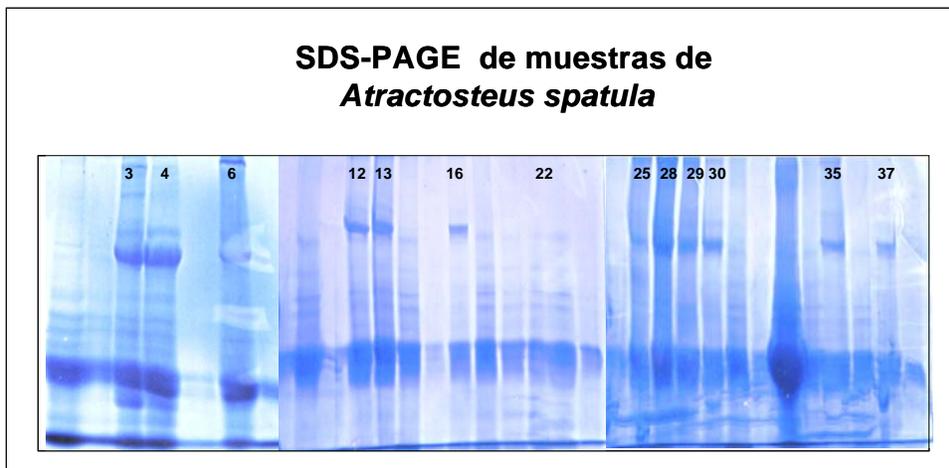


Figura 9.- Sexado del lote de reproductores del Centro acuícola de Tancol de *Atractosteus spatula*, mediante la técnica de electroforesis.

b) La Laja, Veracruz

Con estas técnicas se determino el sexo de los 75 juveniles de catán capturados en la Laguna de Tamiahua y mantenidos en un estaque rustico en La Laja. Un gel representativo

de electroforesis (Fig 10) y de las pruebas cruzadas (Fig 11) es presentado a manera de ejemplo.

Tabla IV Características morfométricas y sexo determinado de los juveniles de La Laja, Veracruz.

No. Organismo	ID Chip	Longitud (cm)	Peso (kg)	Sexo*
1	039*852*081	66	2.35	M
2	039*860*830	77	3.0	M
3	039*842*610	62	1.65	M
4	040*028*073	89	4.5	H
5	039*865*038	82	4.0	H
6	039*571*350	85	2.8	H
7	040*027*893	86	3.0	H
8	039*567*574	82	3.5	H
9	039*842*321	77	2.7	M
10	039*597*607	81	2.9	H
11	039*622*781	69	2.4	M
12	039*820*846	86	3.5	H
13	039*853*554	76	2.9	M
14	039*566*337	71	2.8	M
15	039*875*303	90	4.5	H
16	039*869*118	94	4.9	H
17	039*771*098	74	2.9	M
18	040*006*783	74	2.75	M
19	039*893*872	76	2.75	H
20	039*773*352	76	2.75	H
21	040*020*579	64	2.0	M
22	039*809*295	72	2.65	M
23	039*567*114	68	2020	M
24	039*624*055	84	3.4	H
25	039*790*268	70	2.20	H
26	039*775*795	82	3.4	H
27	040*048*878	74	2.6	M
28	039*611*828	73	2.5	M
29	039*847*556	74	2.8	M
30	039*575*827	75	3.0	M
31	040*031*550	74	3.0	M
32	040*033*107	77	3.0	M
33	040*020*794	78	3.3	M
34	039*874*275	73	2.8	H
35	040*013*819	73	2.75	M
36	040*044*777	74	2.4	M
37	039*621*281	82	3.55	H
38	039*867*802	86	3.9	M
39	039*861*308	70	2.4	M
40	040*029*058	75	3.0	H
41	039*808*095	77	3.1	M
42	039*843*371	80	3.0	H
43	040*016*042	79	3.4	M
44	039*782*524	71	2.55	M

45	039*599*029	63	2.10	M
46	039*842*092	76	3.15	M
47	039*873*540	82	3.8	H
48	039*829*775	85	4.2	M
49	039*605*845	80	3.6	M
50	039*575*281	92	4.75	H
51	039*594*028	89	4.1	H
52	039*591*022	79	3.8	M
53	039*888*093	70	2.20	M
54	039*611*297	90	4.35	H
55	039*638*055	93	4.05	H
56	040*046*120	80	2.65	H
57	039*865*299	66	0.85	M
58	040*018*323	93	4.05	H
59	039*780*876	76	2.45	M
60	039*804*589	61	3.15	M
61	039*791*793	83	2.2	H
62	039*893*620	80	2.55	H
63	039*567*052	82	2.9	M
64	040*049*102	77	2.45	H
65	039*797*109	91	3.75	H
66	039*554*537	68	1.65	M
67	040*019*860	85	3.05	H
68	040*029*269	76	2.35	M
69	040*014*533	87	3.35	H
70	039*792*315	71	2.1	M
71	039*892*579	67	1.55	M
72	040*032*530	68	1.65	M
73	039*597*058	64	1.25	M
74	039*870*335	74	2.05	M
75	039*858*364	74	1.85	M
Media		77.33	2.92	M = 44
SD		8.01	0.82	H = 31

* M = Macho; H = Hembra

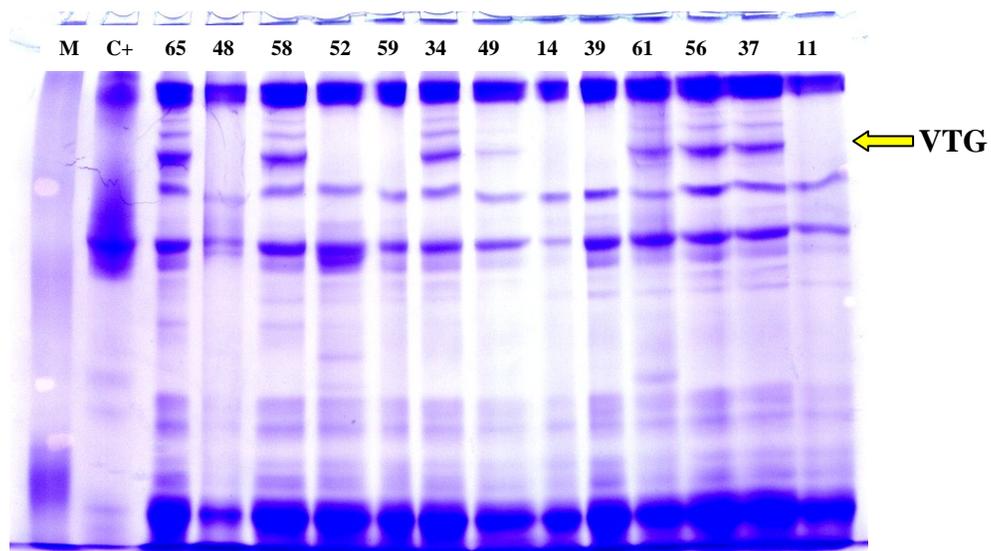


Figura 10.- Sexado del lote de juveniles de La Laja de *Atractosteus spatula*, mediante la técnica de

electroforesis.

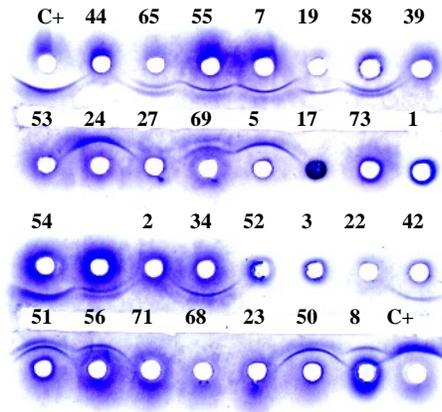


Figura 11.- Sexado del lote de juveniles de La Laja de *Atractosteus spatula*, mediante la técnica de pruebas cruzadas.

b) El Huasteco

Igualmente con las técnicas de electroforesis y pruebas cruzadas se determino el sexo del lote de juveniles silvestres de catán, capturados en la Presa Vicente Guerrero y transportados a las instalaciones de la granja Desarrollo Acuícola "El Huasteco"

Tabla V Características morfométricas y sexo determinado de los juveniles de El Huasteco.

No. Organismo	ID Chip	Longitud (cm)	Peso (kg)	Sexo*
1	039 843 269	67	1.5	M
2	039 560 048	72	1.4	H
3	040 025 779	69	1.7	H
4	040 019 581	90	3.8	H
5	040 031 883	80	2.8	H
6	039 883 872	71	1.9	H
7	039 590 807	78	2.4	H
8	039 777 542	84	3.3	H
9	039 845 782	61	1.5	M
10	040 319 825	70	1.7	M
11	039 633 622	62	1.2	M
12	039 829 375	76	2.9	H
13	039 887 575	78	3	M
14	040 046 315	74	2.8	H
15	039 612 882	69	1.8	H
16	040 046 324	78	2.5	H
17	039 876 618	85	3	H

18	039 576 321	85	3.4	H
19	039 794 281	76	3.1	M
20	039 776 314	77	1.8	M
21	039 556 582	69	3.1	H
22	040 004 613	80	2.6	H
23	040 017 867	82	2.8	H
24	039 049 111	66	1.3	M
25	039 893 809	83	2.9	H
26	039 603 099	73	2.2	M
27	039 883 568	65	1.7	M
28	039 803 297	70	2.1	H
Media		74.64	2.36	M = 44 H = 31
SD		7.44	0.72	

* M = Macho; H = Hembra

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que es posible identificar el sexo de ejemplares de catán, mediante una reacción inmunológica entre la VTG plasmática de *A. tropicus* y el suero anti-VTG producido a partir de la proteína purificada. 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 teleósteos, en los cuales 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 E₂ en los machos de *A. tropicus* haya provocado la síntesis de VTG puede ser demostrada de diversas maneras. El suministro de E₂ 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 E₂ 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).

En investigaciones anteriores, se han utilizado una gran variedad de técnicas para la purificación de la lipovitelina ovárica de distintas especies de peces, adicionando una etapa de separación inicial de precipitación con EDTA-MgCl₂ (Wiley *et al.*, 1979; Norberg y Haux, 1988; Inaba *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1998), para concentrar y asilar por completo la lipovitelina ovárica, del resto de los componentes del ovario, ya que el EDTA-MgCl₂ se une a los grupos fosfatos de la molécula y aumenta su masa y la precipita. Siendo particularmente eficaz cuando se presentan concentraciones elevadas de VTG (Norberg y Haux, 1988). Esta técnica de precipitación, nos permitió la obtención de una lipovitelina ovárica más pura, en su conformación nativa, para la realización de una purificación mas específica.

La técnica de precipitación mencionada anteriormente no fue suficiente para la separación total de la lipovitelina ovárica de los otros componentes del ovario. Por lo cual, fue necesario la separación de la lipovitelina ovárica, mediante la combinación de la cromatografía de exclusión molecular e intercambio de iones. Al igual que en otras

investigaciones como es el caso de *Oncorhynchus mykiss* (Tyler y Lancaster, 1993), *Cyprinus carpio* (Tyler y Sumpter, 1990), *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994). Estas técnicas de cromatografía han sido utilizadas en investigaciones anteriores, ya que ofrecen la ventaja de disponer de la molécula en fase líquida, lo que permite continuar con su ulterior purificación por medio de diferentes técnicas (cromatografía de afinidad, electroforesis, etc) (Cortés, 2000). Entre los medios de filtración en gel que han producido mejores resultados para la purificación de la VTL y la VTG en peces se encuentra la Sepharosa- 6B (Copeland *et al.*, 1986; Copeland y Thomas, 1988; Tyler *et al.*, 1988; Tyler y Sumpter, 1990, Pelissero *et al.*, 1991, Tyler y Lancaster, 1993; Mañanós *et al.*, 1994). Sin embargo, el Sephacryl, un medio que presenta características similares a la Sepharosa, presenta mejor estabilidad química a diferentes amortiguadores en un mayor rango de pH y soporta una presión más elevada, lo que permite procesar una mayor cantidad de muestras en un menor tiempo (Cortés, 2000). Este medio también ha sido utilizado exitosamente en la purificación de la VTG y la VTL de *Diodon holocanthus* (Fujita *et al.*, 1998), por lo cual se decidió utilizarlo para la purificación de la lipovitelina ovárica de *Atractosteus spatula*. La técnica de precipitación mencionada anteriormente no fue suficiente para la separación total de la lipovitelina ovárica de los otros componentes del ovario. Por lo cual, fue necesario la separación de la lipovitelina ovárica, mediante la combinación de la cromatografía de exclusión molecular e intercambio de iones. Al igual que en otras investigaciones como es el caso de *Oncorhynchus mykiss* (Tyler y Lancaster, 1993), *Cyprinus carpio* (Tyler y Sumpter, 1990), *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994). Estas técnicas de cromatografía han sido utilizadas en investigaciones anteriores, ya que ofrecen la ventaja de disponer de la molécula en fase líquida, lo que permite continuar con su ulterior purificación por medio de diferentes técnicas (cromatografía de afinidad,

electroforesis, etc) (Cortés, 2000). Entre los medios de filtración en gel que han producido mejores resultados para la purificación de la VTL y la VTG en peces se encuentra la Sepharosa- 6B (Copeland *et al.*, 1986; Copeland y Thomas, 1988; Tyler *et al.*, 1988; Tyler y Sumpter, 1990, Pelissero *et al.*, 1991, Tyler y Lancaster, 1993; Mañanós *et al.*, 1994). Sin embargo, el Sephacryl, un medio que presenta características similares a la Sepharosa, presenta mejor estabilidad química a diferentes amortiguadores en un mayor rango de pH y soporta una presión más elevada, lo que permite procesar una mayor cantidad de muestras en un menor tiempo (Cortés, 2000). Este medio también ha sido utilizado exitosamente en la purificación de la VTG y la VTL de *Diodon holocanthus* (Fujita *et al.*, 1998), por lo cual se decidió utilizarlo para la purificación de la lipovitelina ovárica de *Atractosteus spatula*.

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.

Sexado de los organismos

La determinación sexual en peces ha venido siendo un problema muy marcado, dentro de la acuicultura, ya que no se cuenta con un protocolo muy preciso. Esto debido, a que el dimorfismo sexual se ha venido marcando con técnicas que se llevan acabo mediante la observación de las características externas de los organismos, obteniendo grandes errores, tal es el caso del tamaño del hocico (Suttkus, 1963; Leon *et al.*, 1978), la forma y tamaño del vientre, el peso y longitud total del organismo (Leon *et al.*, 1978). Así mismo, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre el peso (Figura 13) y la longitud total del organismo (Figura 14). Sin embargo, este método de sexado resulta ser difícil al sexar organismos inmaduros, ya que para, poder diferenciar a las hembras de los machos es necesario que las gónadas se encuentren desarrolladas, para que se observe el tamaño y la forma del vientre (Netch y Witt, 1962; Morales, 1987; Bejerano *et al.*, 1997). Por lo cual, este protocolo se puede aplicar exclusivamente a organismos maduros.

Por otra parte, existen investigaciones donde determinan el dimorfismo sexual en peces mediante la aplicación de pruebas bioquímicas (Craik y Harvey, 1984) e inmunológicas (Copeland, 1986; Copeland y Thomas, 1988; Benfey *et al.*, 1989; Tyler y Sumpter, 1990; Mañanós *et al.*, 1994; Kishida y Specker, 1994; Fujita *et al.*, 1998; Takemura y Oka, 1998), por lo cual en el presente estudio, se implemento la técnica inmunológica de pruebas cruzadas, obteniendo resultados satisfactorios, ya que se pudo determinar el sexo de los 39 organismos de campo (Figura 11). Siendo estos métodos inmologicos mas confiables y mas exactos, que las determinaciones por características externas de los organismos.

CAPITULO 2

INDUCCION A LA MADUREZ SEXUAL

ANTECEDENTES

Estudios sobre reproducción en catan y otros lepisosteidos

A pesar de la existencia de algunas descripciones sobre las reproducción de los lepisosteidos, se conoce muy poco acerca de los aspectos básicos sobre los hábitos reproductivos de *A. spatula* (Breder y Rosen, 1966).

Hasta el momento el cúmulo más importante de información acerca de los aspectos reproductivos de los catanes corresponde a las observaciones realizadas en el medio natural por diversos autores Norteamericanos sobre varias de las especies del orden y a los estudios realizados sobre el pejelagarto en Tabasco. Tomando esto como base se presenta a continuación una semblanza de la biología reproductiva de los lepisosteidos.

Proporcion Sexual

Los lepisosteidos presentan un comportamiento poco gregario, sin embargo durante la temporada de reproducción se les puede encontrar comúnmente formando grupos de decenas de individuos, habiéndose observado hasta más de 20 al mismo tiempo (Alemán, 1987; Deán, 1895; Holloway, 1954). Las hembras encabezan los grupos de reproductores, mientras que los machos avanzan detrás expulsando el esperma que fecundará los óvulos, los cuales son adherentes y se fijan a la vegetación sumergida (Contreras, 1987).

De manera general, se observa siempre un mayor número de machos que de hembras. Suttkus, (1963) menciona igualmente que cuando las hembras van a desovar se hacen acompañar de uno a cuatro machos. En el caso del pejelagarto *A.*

tropicus se han reportado relaciones macho: hembra que van desde 0.82:1 (Chavez-Lomelí, 1989), pasando por proporciones de 1:1.2 (Resendez y Salvadores 1983), 3:1 (Bejerano *et al.*, 1997), hasta proporciones de 5:1 (Gómez-Gómez, 1989; Pérez-Sanchez, 1995). Holloway (1954) reporta proporciones de 1:2 y de 1:1 machos por hembra para *Lepisosteus platyrhincus* y señala proporciones que varían de 1:2 a 3:1 machos por hembra para *L. Osseus*.

Sin embargo, las observaciones realizadas en el medio natural deben ser tomadas con cautela, ya que como lo señalan Netch y Witt (1962), existe una gran diferencia entre machos y hembras con respecto a longevidad y velocidad de crecimiento. Las hembras presentan una mayor velocidad de crecimiento y viven más tiempo que los machos. Así por ejemplo, en el caso de *L. osseus*, para el final del primer año los machos experimentan una gran mortalidad y están casi ausentes de la población. En contraste, en los registros se encuentran hembras de hasta 22 años. La diferencia en longevidad entre hembras y machos causa cambios drásticos en la proporción de sexos. Así, esta proporción a partir de muestras combinadas en el caso de *L.osseus* es de 1.2:1 machos por hembra, sin embargo esto es valido solo cuando se trata de juveniles, ya que cuando se trata de organismos adultos por causa de la longevidad esta tasa se altera y la proporción cambia en sentido contrario.

La proporción sexual que se ha venido utilizando en Tancol durante la época reproductiva en cautiverio de los catanes (*A. spatula*) es de 2 machos por hembra (Morales, 1987). Por su parte, Rodríguez *et al.* (1998), marcan una proporción de 1:10.5 machos por hembra en la presa Vicente Guerrero, localizada en Tamaulipas.

Comportamiento Reproductivo

Dean (1895) describe el comportamiento reproductivo para *Lepisosteus spp.* en Black Lake, Carolina del Sur, e indica que primeramente se les percibe en las

regiones profundas del lago y posteriormente se les ve cerca de la orilla. Es común ver cardúmenes de 20 o más en la proximidad de las regiones de menor profundidad, en donde desovan. Al aproximarse a la orilla los cardúmenes se fragmentan y se separan por grupos. Cada hembra se hace acompañar de 2 - 8 machos, los cuales nadan unos cerca de otros. El hocico de los machos, de color más claro, probablemente una coloración relacionada con la época reproductiva, presiona la región abdominal de la hembra. En este momento nadan con las aletas extendidas, y particularmente las dorsales y anales se encuentran erectas, de tal manera que estas últimas junto con la caudal son perceptibles desde lejos, mientras comienzan a entrar en aguas muy bajas (12.5 a 15cm de profundidad). Posteriormente a su arribo, se presenta un período de quietud, el cual es seguido por movimientos hacia adelante, hacia atrás y en círculos, cerca de la orilla, y minutos más tarde se presentan movimientos bruscos. Es en este momento que los huevos son expulsados y fertilizados, pudiéndose apreciar nubes de espermatozoides en el agua. Este evento alterna con otro período de quietud de varios minutos el cual es seguido por movimientos circulares y una segunda ovoposición. El desove por lo general no ocurre durante las horas más calurosas del día (12:00 - 15:00), sino que se presenta a intervalos entre las 19:30 y 20:30. Es probable que no todos los huevos sean depositados por la hembra durante un solo día. Los desoves en el caso del pejelagarto (Pérez-Sánchez, 1995) y del catán (Morales, 1987) ocurren durante la noche, llegando a prolongarse hasta el día siguiente. La gran concentración de individuos que se reúnen en las áreas de desove, se dispersa de inmediato a otras áreas después del evento reproductivo (Suttkus, 1963)

Un aspecto notable es la docilidad de los peces, ya que inclusive cuando se están apareando se les puede aproximar de muy cerca. Sin embargo, cuando se llega a

capturar una hembra se produce una señal de alarma en la población, la cual es mucho más importante que si se capturan varios machos. En ningún caso se observaron evidencias de rivalidad entre los machos.

La resistencia de los adultos es remarcable. Así, Dean (1895) describe como pueden permanecer hasta dos horas fuera del agua., permanecer vivos, activos y aún proveer huevos y esperma para la fertilización artificial.

Un comportamiento similar ha sido descrito por León *et al.* (1978) en el caso de la reproducción en condiciones de cautiverio del manjuari (*A. tristoechus*) y por Morales (1987) en el caso del catán (*A. spatula*). Sin embargo, vale la pena mencionar que en el primer caso, después de que los grupos de óvulos son fecundados, es necesario sacar a los machos del estanque ya que comienzan a comerse los huevos.

Existen evidencias de que varias de las especies realizan migraciones para desovar, como el caso de *L. osseus* (Netch y Witt, 1962).

Fecundidad

De manera general, la fecundidad de los lepisosteidos es elevada, y el número de huevos aumenta con la talla de la hembra (Halloway, 1954). Para *A. tropicus* se reportan fecundidades absolutas de 378 a 22,530 huevos por hembra (de 35,000 a 1,130,000 por kg), con una fecundidad promedio de 12,958 para una talla de promedio 64.5 cm (Chávez-Lomelí *et al.*, 1989). En contraste con estas observaciones, Mendoza *et al.* (1993) reportan fecundidades de 8,787 ovocitos por kg de hembra para la misma especie. En el caso de *L. platyrhincus*, Holloway (1954) señala un promedio de 5,200 huevos por hembra. Para *L. osseus* se han reportado más de 36,000 huevos para una hembra de 100 cm (Breder y Rosen, 1966). La fecundidad para *L. osseus* se ha estimado en 30,000 a 77,156 huevos por hembra

(Holloway, 1954). Para esta misma especie se han reportado de 4,000 a 59,000 huevos por hembra, con un promedio de 27,000 por hembra, lo que resulta en 6,000 huevos por kg (Netch y Witt, 1962). Para el manjuari (*A. tristoechus*) la fecundidad absoluta se calculó en 4,000 y 6,711 huevos/kg en hembras con un índice gonadosomático entre 6 y 10. Mientras que en las hembras de *A. spatula* desovan en promedio 4,000 huevos por kg de peso (Morales, 1987).

Vale la pena mencionar que existen ciertas anomalías registradas en función de la edad de las hembras. Así, se han señalado casos de ejemplares con un número de huevos anormalmente pequeños y muy escasos, como consecuencia de la edad de los progenitores (Holloway, 1954). Igualmente, se ha observado que cuando los catanes no encuentran condiciones adecuadas para desovar, reabsorben los huevos (Morales, 1987).

Sustrato

Todos los lepisosteidos requieren de un sustrato para desovar (Bejarano *et al.*, 1997). Así en el medio natural *L. osseus* deposita sus huevos sobre rocas o cubiertas de algas. Mientras que *L. platostomus* deposita los huevos en pequeñas masas sobre pastos y algas. *L. ocelatus* desova sobre vegetación muerta y cubiertas de algas (Simon y Wallus, 1989). Se ha señalado que a pesar del carácter relativamente uniforme de la orilla de los lagos en donde se reproducen, existen ciertos lugares en los que prefieren desovar (Dean, 1895).

Considerando estos aspectos, en la reproducción en cautiverio se recurre a la confección de “nidos”, en donde los animales colocan sus huevos. En el caso del manjuarí (*A. tristoechus*) se utilizan nidos de pino, ya que tienen menos posibilidad de encontrarse contaminadas con parásitos de los peces y resisten una gran cantidad de días bajo el agua sin descomponerse (León *et al.*, 1978). Frecuentemente, se

construyen nidos con ramas insertadas en trozos de malla, ya que así pueden ser trasladados a otros estanques y por otra parte ofrecen la facilidad de poder retirar los huevos muertos y los óvulos no fecundados para evitar la extensión de la saprolegniosis.

En el caso del catán (*A. spatula*), previamente se colocan ramas de casuarina en los extremos y centro de los estanques que servirán como sustrato para los huevecillos de naturaleza adherente (Morales, 1987).

Para los desoves del pejelagarto (*A. tropicus*) se han ensayado diversos sustratos y actualmente se utilizan pastos (G. Marquez comunicación personal).

Fertilizacion Artificial

La posibilidad de llevar a cabo la fertilización artificial no es de ninguna manera remota, ya que desde 1895, Dean describió la utilización del método seco para llevar a cabo la fertilización artificial de huevos de lepisosteidos. En breve, menciona la extrusión de huevos de una hembra recién capturada y la fertilización de estos por algunas gotas de esperma de un macho maduro. En seguida los huevos fueron agitados y minutos más tarde se les añadió agua. A medida que se volvieron adherentes se les dispersó sobre una charola de eclosión cubierta por una malla y así fueron transportados hasta el laboratorio. Señala que resulta más conveniente la excisión de los ovarios que la obtención de huevos por presión abdominal de la hembra. De manera interesante, reporta haber realizado diversos ensayos de fertilización artificial, todos con éxito.

De igual manera, Leon *et al.* (1978), realizaron la fertilización artificial con el manjuarí (*A. tristoechus*) mediante el método seco. En este caso la fecundación de los óvulos se realizó a los 40 minutos de estar desovando las hembras. Se utilizó hialuronidasa durante 10 minutos para librar los huevos de la sustancia adhesiva y

posteriormente los huevos se colocaron en una canaleta de incubación para huevos de carpa.

Eclosion

El período de incubación hasta la eclosión es igualmente variable. En el caso de *L. osseus* la eclosión se realiza entre 3 y 9 días dependiendo de la temperatura, regularmente tarda 6 días a 20o C. Se ha reportado que los huevos aún secos y fuera del agua pueden ser eclosionados en laboratorio (Breder y Rosen, 1966). Echelle y Riggs (1972), reportan que para diferentes especies de lepisosteidos se requieren de 5 a 10 días para la incubación de los huevos. (20 a 30 °C).

Para el caso del *A. tropicus*, se ha estimado que un 75 % de los huevos eclosionan a las 48 horas de incubación cuando la temperatura del agua es de 30°C y que las unidades de temperatura celcius (CTU) necesarias para alcanzar el 80% de eclosión esta dada por la relación $UTC = 216.7 - 5.3 * Temp.$ (Márquez, 1998). Mientras que en el caso del catán el período de incubación dura aproximadamente 57 horas (de 50 a 62) horas a 27 °C (Morales, 1987).El control de los diversos procesos relacionados con la reproducción de los peces (maduración gonadal, ovulación y desove) para la obtención de crías en la acuicultura es una de las principales metas a alcanzar para el establecimiento exitoso de un cultivo acuícola. De esta forma, la aplicación de un protocolo de inducción adecuado permitiría extender las temporadas de reproducción con el consecuente aumento en el número de crías obtenidas, lo que beneficiaría el establecimiento de las pesquerías y cultivos de la o las especies de interés. A este respecto, se ha puesto especial atención sobre investigaciones en el campo de la neuroendocrinología de los peces en relación a la maduración gonadal, lo que ha llevado al desarrollo de aplicaciones potencialmente importantes en el campo de la piscicultura.

Inducción a la madurez sexual

La inducción a la maduración sexual se puede lograr mediante dos tipos de estímulos: medioambientales y hormonales. La vía medioambiental permite la obtención de crías de mayor calidad, una mínima manipulación de los progenitores, bajas mortalidades y la independencia de inductores químicos (Bejerano *et al.*, 1997), sin embargo requiere de una infraestructura especial para regular factores tales como el fotoperiodo y la temperatura, además de la necesidad de proporcionar una alimentación especial a los reproductores. Por otra parte, la inducción por medio de la manipulación hormonal ofrece múltiples ventajas, dentro de las cuales destacan la posibilidad de extender el ciclo reproductivo más allá de la temporada natural de reproducción, lo que repercute invariablemente sobre la producción de crías y incrementando la flexibilidad para la programación de la producción de larvas sin necesidad de emprender modificaciones ambientales onerosas.

En efecto, debido a su facilidad de utilización y rápida respuesta, muchos investigadores han optado por la aplicación de diversos estímulos hormonales, entre los que se encuentran: antiestrógenos (Citrato de Clomifeno, Tamoxifeno); antagonistas de la Dopamina (Pimozido), los cuales actúan a nivel de hipotálamo; También se han utilizado los GnRH (factores liberadores de gonadotropinas) y sus análogos (GnRH-a), que actúan a nivel de pituitaria; así mismo, se han utilizado estrógenos (17- β -estradiol) para inducir a la vitelogénesis. A nivel gonadal se han utilizado extractos de pituitaria de peces, para estimular la terminación de la vitelogénesis; progestágenos para inducir la maduración final del ovocito y prostaglandinas (PGF₂) para la inducción a la ovulación.

Control medioambiental de 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 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 interpretados por el sistema nervioso central en señales fisiológicas (hormonas) que provocan una respuesta en algún tejido específico del cuerpo (Patiño, 1997).



Fig 12.-Estimulos ambientales

Control hormonal de la reproducción

El proceso reproductivo está regulado por las secreciones hormonales del hipotálamo y la hipófisis. Esta última se encarga en particular de sintetizar y exportar las gonadotropinas (GtH), las cuales son órganos estrechamente relacionados en la reproducción de las hembras durante la vitelogénesis, maduración, ovulación y secreción de esteroides (Zanuy y Carrillo, 1987; Nagahama, *et al.*, 1993; Silverstein, *et al.*, 1999). 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 emparentadas con las gonadotropinas (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. De igual forma, las gónadas participan activamente en la maduración sexual de los peces, así tenemos que los testículos y ovarios 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).

Existe cierta controversia acerca de la influencia de las gonadotropinas (GtH) sobre la previtelogénesis, ya sea per se o a través de su influencia sobre la esteroideogénesis ovárica (Verreth, *et al.*, 1987). Sin embargo, está bien claro que la vitelogénesis es totalmente dependiente de la secreción gonadotropa de la hipófisis (Ng y Idler, 1983; Peter, 1983; Lam, 1985; Zanuy y Carrillo, 1987; Sherwood, 1987).

Actualmente, se ha aceptado la existencia de dos gonadotropinas hipofisarias con distintas funciones en los teleósteos (Peter, 1993; Powell, *et al.*, 1993). Los dos tipos de GtH 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). A estas hormonas también se les denominan como GtH vitelogénica y GtH madurativa (Zanuy y Carrillo, 1987). La hormona madurativa, estimula la esteroidogénesis folicular y la hormona vitelogénica, permite la entrada de la VTG al interior del ovocito (Zanuy y Carrillo, 1985). Sin embargo, la presencia de la hormona madurativa también es necesaria para que se inicien los procesos vitelogénicos (Verreth, *et al.*, 1987).

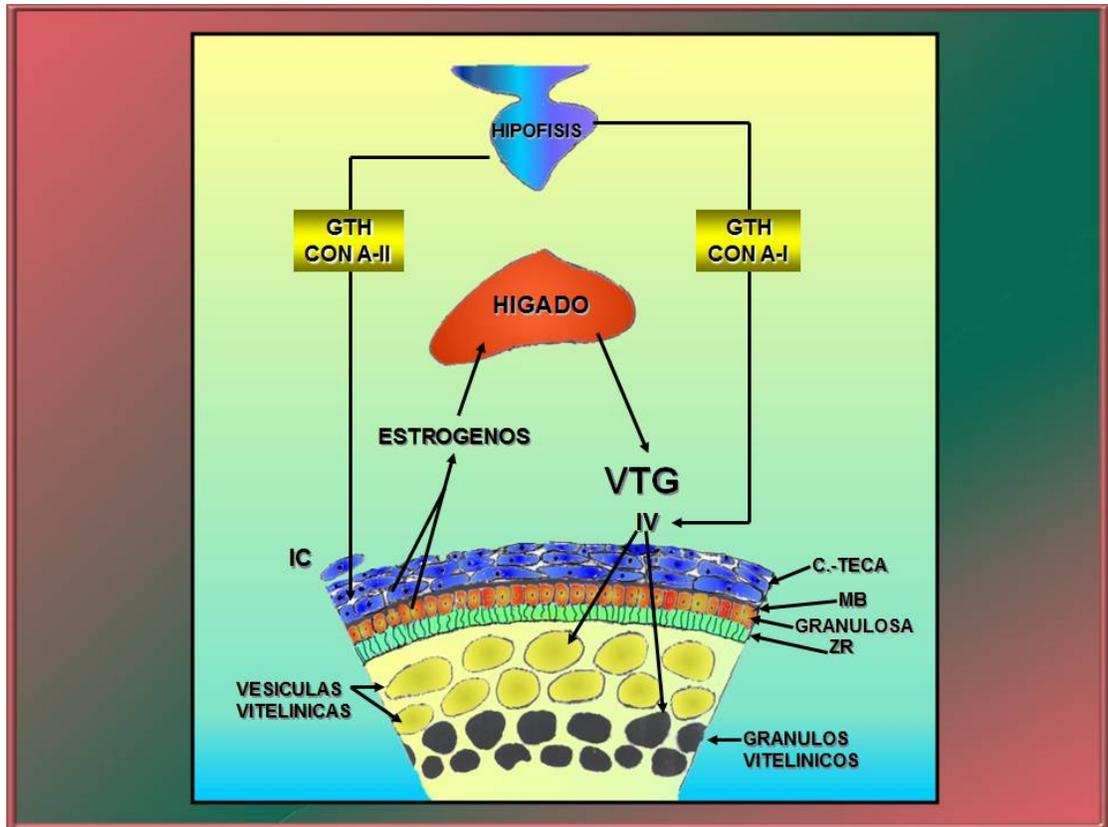


Fig 13.-Figura ilustrando el modo de acción de las gonadotropinas vitelogeica y madurativa (GtH-I, GtH-II)

Los factores liberadores de gonadotropinas (GnRH) de origen hipotalámico, tienen como principal función la estimulación de la síntesis y liberación de gonadotropinas (Nagahama, 1987), mientras que los factores inhibidores (GnRIF), actúan a nivel de la pituitaria, bloqueando la liberación espontánea de las gonadotropinas (Peter, 1983). 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 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).

Cuando los niveles adecuados de GtH son alcanzados, la vesícula germinativa migra hacia la periferia y las células de la teca y granulosa del folículo son estimuladas para secretar un esteroide (17α 20β dihidroxiprogesterona) (Maturative Inducing Steroid -MIS-) el cual induce la maduración ovocitaria y sus eventos asociados (Nagahama, 1987).

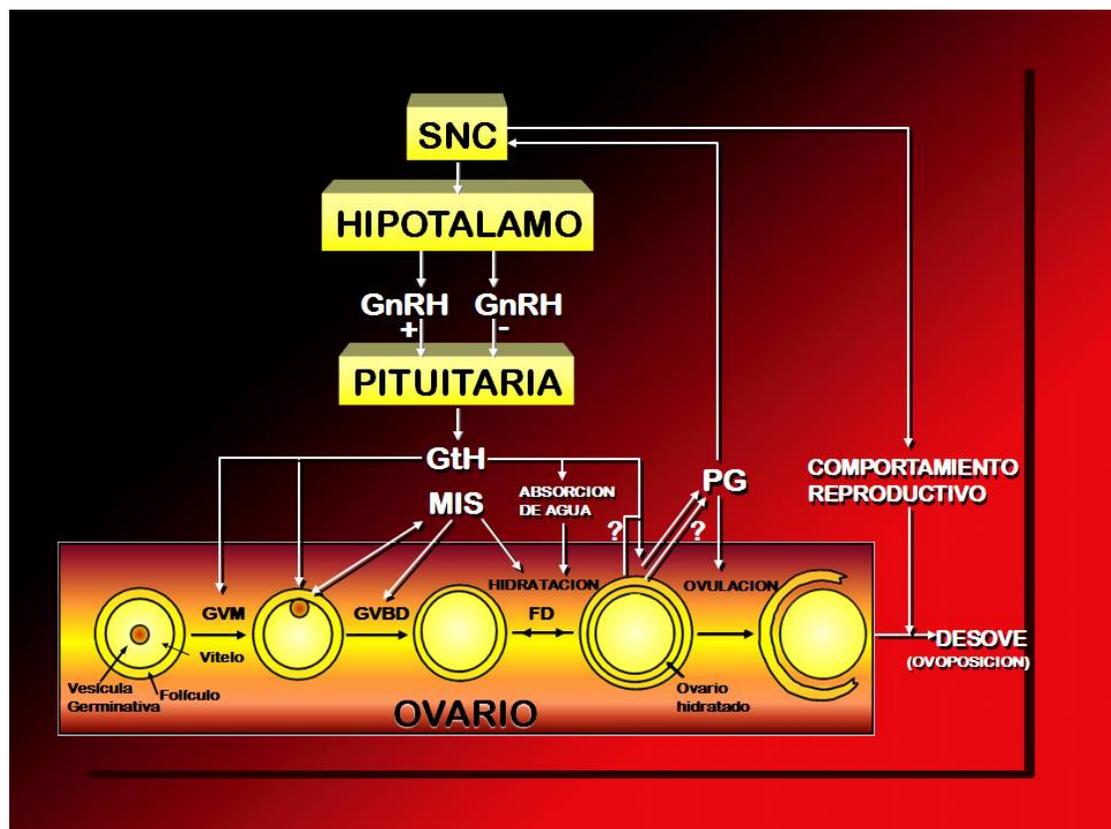


Fig 14.- Pasos de la maduración ovocitaria

Por otra parte, los antiestrógenos (citrato de clomifeno, tamoxifeno), antagonistas de la dopamina (pimozido) y los análogos GnRH pueden estimular la secreción de GtH y la ovulación en peces mediante un feed-back negativo. Mientras que los corticosteroides, inducen la maduración y la ovulación, siendo el cortisol, la cortisona y la corticosterona los más comúnmente utilizados. La acción de estas hormonas se puede incrementar mediante la inyección de GtH y de extractos de pituitaria (Lam, 1985). Finalmente, las prostaglandinas pueden ser utilizadas como mediadores de la acción de las gonadotropinas sobre la ovulación (Lam, 1985) .

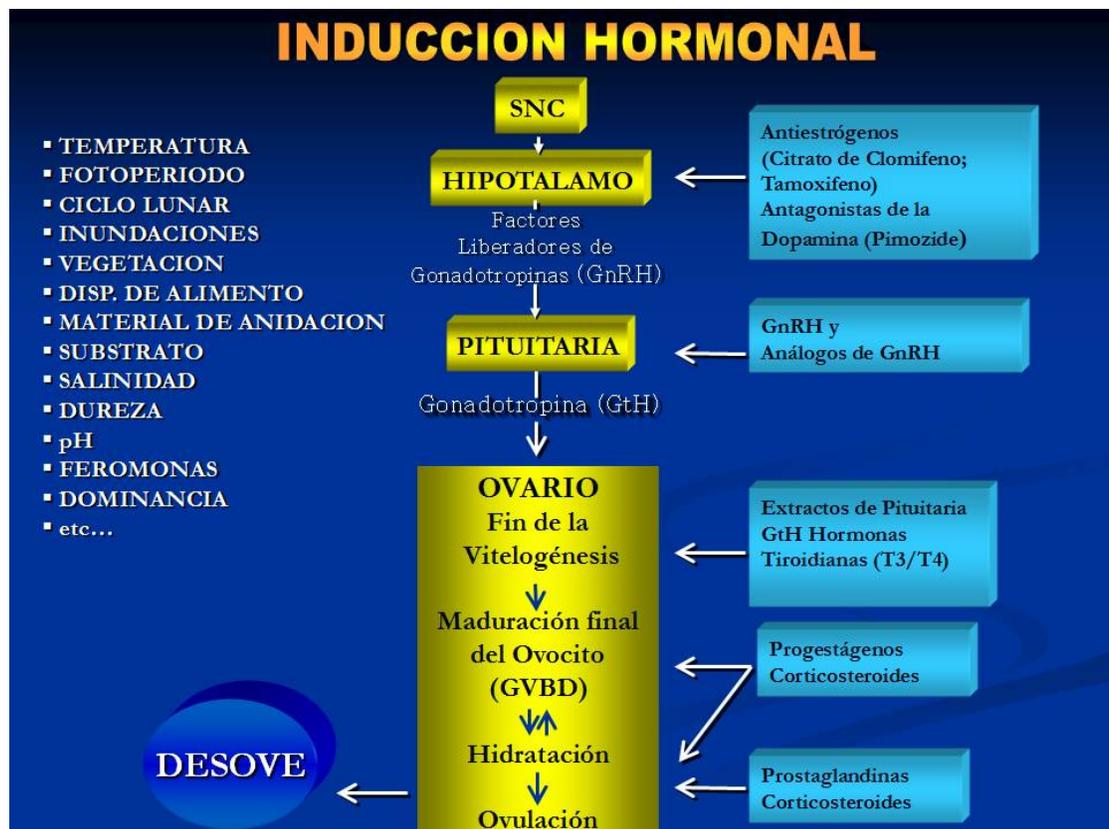


Fig 15.- Intervencion de factores extrinsicos, hormonas y sus analogos en la induccion hormonal

Por otra parte, en el caso de los machos, 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 esteroideogénica

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, 17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona, 17 α , 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, 11-progesterona y pequeñas cantidades de estrógenos (Barry *et al.*, 1993 en 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).

Inducción a la maduración sexual en lepisosteidos.

Dentro de los escasos estudios que se han llevado a cabo para la inducción a la madurez sexual y desove de los lepisosteidos, vale la pena mencionar los realizados por León *et al.* (1978) con el manjuarí (*A. tristoechus*). Estos autores reportan la ausencia de eficacia de extractos hipofisarios de carpa, así como de un protocolo en el que se utilizaron en conjunto GCH e hipófisis de carpa (150 UI. De GCH y 100 UI. y al día siguiente 6 mg de hipófisis de carpa/hembra de 1,500 g). Sin embargo, lograron tener éxito al ensayar inducciones tanto en machos como en hembras con hipófisis de manjuarí (hembras de 3 - 3.5 kg inyectadas con 6 mg de hipófisis y machos de 1.6 - 2 kg con 4.5 mg), los organismos fueron inyectados 35 días después nuevamente con 3mg (hembras y machos). En este caso se seleccionaron los animales por el abultamiento del abdomen y por su papila genital más coloreada y pronunciada. Se obtuvieron desoves con un alto porcentaje de eclosión (más de 85%). Se reporta igualmente un intento fallido de inducción, al cual se le atribuye

una mala calidad de la hipófisis, ya que esta llevaba años almacenada.

Pérez-Sánchez (1995) llevo a cabo ensayos de inducción con pejelagarto utilizando dos concentraciones de GCH (2500 y 3500 UI por kg de peso). La dosis fue fraccionada, administrándola en 10 aplicaciones, una cada 48 hrs. vía intraperitoneal. La GCH tuvo un efecto positivo sobre los machos, los cuales alcanzaron un estadio de desarrollo más avanzado con respecto al control. Sin embargo, las dosis usadas no fueron suficientes para llevar a los organismos hasta la espermiación. Por otra parte, si las condiciones ambientales no son adecuadas, el efecto de la hormona se ve reducido o anulado de acuerdo a lo observado en organismos sacrificados 30 días después de la última inyección. Esto se confirma por las observaciones de Bejerano *et al.* (1997), quienes señalan que la inducción debe llevarse a cabo en la temporada de desove natural para asegurar que los progenitores estén maduros. Este puede ser inducido con Ovaprim a razón de 0.5 ml/kg de hembra, y los machos no requieren ser inyectados. Hasta el momento, el producto del desove inducido de los pejelagartos ha sido negativo. En este caso, los esfuerzos se han dirigido a simular las condiciones de las áreas naturales de desove para de esta manera provocar la reproducción de la especie en cautiverio (Contreras *et al.*, 1989). Para este efecto se habilitó una zona pantanosa que presentaba vegetación típica de las zonas de desove. Esto permitió la obtención de desoves viables, demostrando así que los reproductores introducidos respondieron en poco tiempo a los estímulos del medio.

Finalmente, para el caso del catán, se han reportado inducciones exitosas con ejemplares de *A. spatula* utilizando GCH (Colunga-Almazan, 1996), sin embargo las crías obtenidas no se desarrollaron bien y se desconoce si esto fue por cuestiones de manejo o bien por la calidad de las mismas.

Como se ha observado, los trabajos que se han realizado hasta la fecha en relación a la reproducción del catán han sido incipientes y se han limitado únicamente al mantenimiento de reproductores en cautiverio, razón por la cual la obtención de crías se ha venido restringiendo a una sola semana durante el año, lo cual evidentemente representa un cuello de botella para su cultivo. De aquí que resulte imperativo ejercer un mayor control sobre la reproducción de los adultos, y considerando que la maduración gonadal está regida por el sistema endócrino, la manipulación hormonal representa la vía más directa para el desarrollo de una reserva de crías. De lo anterior se deriva la necesidad de conocer las bases fisiológicas de la reproducción de la especie.

MATERIAL Y METODOS

Debido a la poca información sobre la fisiología reproductiva de esta especie, la presente investigación se apoyó en las experiencias obtenidas en los ensayos de inducción realizados con organismos de otras especies y algunas del mismo género (Sherwood, 1991; León et, al., 1978.)

La inducción hormonal se llevo a cabo utilizando diferentes protocolos de acuerdo al tipo de hormona y utilizando tres ejemplares de catan por cada tratamiento con una relación de dos machos por una hembra Las hormonas con las que se experimentó se enlistan en la siguiente Tabla:

Tabla VI Hormonas Utilizadas

HORMONAS	DOSIS
Extracto de pituitaria de salmón (sGTH)	12µg/hembra
Ovaprim (Factor liberador de gonatropinas de salmón + Domperidone)	0.5 mg/kg
Análogos Superactivos ((D-Ala-6, des-Gly-NH2-10)-LH-RH ethylamide) y D-Ala6-LHRHa	35 µg /Kg
Suero fisiológico (testigo)	0.5ml/ Individuo

Bioensayos

Se llevaron a cabo un total de ocho bioensayos en tres diferentes sitios:

Centro Acuícola Tancol en Tampico Tam., Desarrollo Acuicola El Huasteco en Gómez Farías Tam y en el Laboratorio de Ecofisiología de la FCB/UANL.

Tancol

Se realizó un bioensayo durante el mes de Octubre del 2003, utilizando los reproductores de Centro Acuícola Tancol. Se definieron cuatro tratamientos, con dos replicas cada uno.

Desarrollo Acuicola El Huasteco

Se realizaron cinco bioensayos con los reproductores del lote establecido en la granja El Huasteco: El primero se realizó en Julio del 2003 El segundo se llevo a cabo en Octubre del 2003 con tres ejemplares adultos colectados en Tamuin S.L.P.. El tercero se efectuó en Junio del 2005, el cuarto Mayo del 2006 y el quinto en Julio 2006. Estos bioensayos, se llevaron a cabo tanto fuera como dentro de la temporada natural de reproducción y desove. Se consideraron dos tratamientos con dos replicas en cada caso.

Lab de Ecofisiología

Se realizaron dos bioensayos fuera de temporada con los reproductores del lote constituido en Octubre del 2003 y Octubre del 2004.

Teóricamente los mes seleccionados brindarían más probabilidades de recuperación gonadal de los individuos, y las temperaturas aun no se manifestarían muy bajas para la consecución del proceso reproductivo. Solo se consideró un tratamiento experimental con dos replicas en este caso.

Bioensayo No 1.- Centro Acuícola Tancol

Se seleccionó un lote de 8 individuos (3 hembras y 5 machos), identificados con microchips, y sexados mediante pruebas cruzadas en el laboratorio. (Presencia de vitelogenina para hembras). Se realizaron dos replicas utilizando las siguientes hormonas:

Tratamiento No 1.- Des Ala 6, se aplicó en dos hembras (peso y talla promedio 21 Kg y 1.47 m) a razón de 35 µg/Kg, y se colocaron en dos estanques diferentes, cada una con dos machos (peso y talla promedio 7.12 Kg y 1.07 m) previamente tratados con 0.5ml/kg de Ovaprim

Tabla VII Bioensayo 1 tratamiento 1 Tancol

LUGAR	No H	Peso Talla	Trat.	Dosis	No M	Peso Talla	Tratamiento	Dosis
Centro Acuicola Tancol	1	26Kg 1.62m	Des Ala 6	35µg/Kg	1	7.5kg 1.10m	Ovaprim	(0.5ml/Kg)
					2	4Kg 1.07m		
	3	6Kg 0.91m						
	4	11Kg 1.18m						
	2	16Kg 1.32m	Des Ala 6	35µg/Kg				

Tratamiento No 2.-Pituitaria de salmón (sGTH), se aplicó en dos hembras (peso y talla promedio 15.5 Kg y 1.39 m) (12 µg/hembra) y se colocaron en dos estanques diferentes, cada una en un estanque cada una con dos machos (peso y talla promedio 9.5 Kg y 1.08 m) previamente tratados con 0.5 ml/Kg de Ovaprim

Tabla VIII Bioensayo 1 tratamiento 2 Tancol

LUGAR	No H	Peso Talla	Tratamiento	Dosis	No M	Peso Talla	Tratamiento	Dosis
Centro Acuicola Tancol	1	18Kg 1.52m	Pitutaria de Salmon	12mg/Kg	1	8kg 1.16m	Ovapim	(0.5ml/Kg)
					2	13Kg 1.14m		
					3	8Kg 1.02m		
	1	13Kg 1.26m	Pituitaria de Salmón	12mg/Kg	4	9Kg 1.03		

Tratamiento No 3.-Ovaprim (0.5ml/Kg), se aplicó en dos hembras (peso y talla promedio 12.5 Kg y 1.15 m) y cuatro machos (peso y talla promedio 8.87 Kg y 1.09 m), se colocaron cada una en un estanque con dos machos

Tabla IX Bioensayo 1 tratamiento 3 Tancol

LUGAR	No H	Peso Talla	Tratamiento	Dosis	No M	Peso Talla	Tratamiento	Dosis
Centro Acuicola TANCOL	2	12Kg	Ovaprim	0.5ml/Kg	1	7kg	Ovaprim	(.5ml/Kg)
		1.05m				1.06m		
		13Kg			2	14Kg		
		1.26m				1.04m		
					3	7.5Kg		
						1.25m		
					4	7Kg		
						1,02		

Tratamiento No 4.-Testigo, 5ml de suero fisiológico en dos hembras (peso y talla promedio 9.5 Kg y 1.02 m) y cuatro machos (peso y talla promedio 8.25 Kg y 1.06 m), se colocaron en un estanque únicamente como testigo

Tabla X Bioensayo 1 tratamiento 4 Tancol

LUGAR	No H	Peso Talla	Tratamiento	Dosis	No M	Peso Talla	Tratamiento	Dosis
Centro Acucola TANCOL	2	7Kg 1.10m	Suero fisiológico	0.5ml/Kg	1	10kg 1.00m	Suero Fisilogico	(0.5ml/Kg)
		12Kg .95m			2	6Kg 1.14m		
					3	9Kg 1.05m		
					4	8Kg 1.05		

Bioensayo No 2.- Desarrollo Acucola El Huasteco el Huasteco

Tratamiento.- La última semana de Julio del 2003 se realizó una inducción hormonal en 3 hembras (peso y talla promedio 3.8 y 1.05cm) y 6 machos de catan (peso y talla promedio 1.63Kg y 0.65cm). Las hembras fueron inducidas con Análogos Superactivos (Des Ala 6) a una dosis de 35 µg/kg, mientras que los machos fueron inyectados con Ovaprim a una dosis de 0.5ml/Kg.

Tabla XI- Bioensayo 2 tratamiento 1 Desarrollo. Acuícola El Huasteco					
LUGAR	No Chip Sexo H	Peso	Talla	Tratamiento	Dosis
Granja Acuicola El Huasteco	2,845	1.8Kg	1.30m	Des Ala 6	35µg/Kg
	4,613	4.2Kg	0.90m		
	3,809	5.4Kg	0.96		
LUGAR	No Chip Sexo M	Peso	Talla	Tratamiento	Dosis
Granja Acuicola El Huasteco	9,111	1.3kg	0.64m	Ovaprim	(0.5ml/Kg)
	6,314	2.05Kg	0.68m		
		1.8Kg	0.65m		
	3,269	1.5Kg	0.61m		
	5,782	1.7Kg	0.70m		
		1.7Kg	0.65m		
	9,825				
3,568					

Bioensayo No 3.-**Desarrollo Acuicola El Huasteco el Huasteco.-**

Tratamiento.- Se realizó durante la tercera semana de Octubre del 2003. Se aplicó Ovaprim en dos machos (peso y talla promedio 8.5Kg y 1.12cm) y una hembra (peso y talla promedio 18Kg y 1.25m) maduros (0.5ml/Kg) traídos de Tamuin SLP, los cuales fueron colocados en un estanque de 2000 m²

XII Bioensayo 3 tratamiento Desarrollo. Acuícola El Huasteco

LUGAR	No Chip Sexo H	Peso Talla	Trat.	Dosis	No Chip Sexo M	Peso Talla	Trat.	Dosis
Granja Acuicola El Huasteco	282	18Kg	Ovaprim	0.5ml/Kg	866	9kg	Ovaprim	(0.5ml/ Kg)
		1.25m						
					845	8.4Kg		
						.80m		

Bioensayo No 4.-**Desarrollo Acuicola El Huasteco el Huasteco.-**

Tratamiento.-. Se realizó durante durante la tercera semana de Junio del 2005. Se aplicó Ovaprim en 14 individuos: 4 hembras (peso y talla promedio 16.6 Kg y 1.27m) y 10 machos (peso y talla promedio 4.97Kg y 0.73m) (0.5ml/Kg) los cuales fueron colocados en un estanque de 2000 m².

XIII Bioensayo 4 tratamiento Des. Acuícola El Huasteco										
LUGAR	No Chip H	Peso	Talla	Tratamiento	Dosis	No Chip M	Peso	Talla	Tratamiento	Dosis
Granja Acuicola El Huasteco	282	19.7Kg	1.25m	Ovaprim	0.5ml/ Kg	111	4.3kg	0.79m	Ovaprim	(.5ml/Kg)
	882	16.5Kg	1.12m			015	5Kg	0.72m		
	883	15Kg	1.48m			568	5.5Kg	0.74m		
	618	15.3Kg	1.25m			269	3.8Kg	0.65m		
						314	4.7Kg	.75m		
						638	74.4Kg	0.75		
						281	g	0.72m		
						099	4.2Kg	0.68m		
						181	4Kg	0.70m.		
						600	5Kg	0.70m		
				5Kg						

Bioensayo No 5.-

Desarrollo Acuicola El Huasteco el Huasteco.-

Se realizo durante la cuarta semana de Mayo del 2006 y se aplicaron los siguientes tratamientos

Tratamiento 1.-(Des Ala 6) 35 μg /kg, en 1 hembra(peso y talla promedio 21.2Kg y 1.47m) y 3 machos (peso y talla promedio 7.6Kg 5.26), tratados con Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) (dos repeticiones)

Tratamiento 2.- (Implante de Ovaprim) en 1 hembra (peso y talla promedio 16.5Kg y 1.29m) y 3 machos (peso y talla promedio 5.25Kg y .81m) con ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) (dos repeticiones)

Tratamiento 3.- Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) en 1 hembra (peso y talla promedio 10.5 Kg y 1.06m) y la misma dosis aplicada a tres machos (peso y talla promedio 5.2 kg y .79m) (dos tratamientos).

XIV Bioensayo 5 tratamiento Desarrollo Acuícola El Huasteco

ESTANQUE	No CHIP	PESO Kg	Long	SEXO	TRATAMIENTO
1 Temp 29°	282	May	1.44	H	Des Ala
	866	24.5	1.13	M	Ovaprim
	769	12	.78	M	Ovaprim
	833	5	.85	M	Ovaprim
		6			
2 Temp 31°	5883	May	1.51	H	Des Ala
	845	18	.82	M	Ovaprim
	015	11.5	.88	M	Ovaprim
	568	6	.80	M	Ovaprim
		5.5			
3 Temp 31°	618	May	1.32	H	Implante Ov
	099	17	.85	M	Ovaprim
	111	6	.89	M	Ovaprim
	365	7	.80	M	Ovaprim
		4.5			
4 Temp 30°	807	May	1.27	H	Implante Ov
	882	16	.76	M	Ovaprim
	2181	5.3	.83	M	Ovaprim
	314	5	.78	M	Ovaprim
		5			
5 Temp 30°	613	May	.96	H	Ovaprim .8
	638	8	.83	M	Ovaprim
	600	5.5	.77	M	Ovaprim
		5.5			
6 Temp 30°	321	May	1.16	H	Ovaprim 1.3
	575	13	.81	M	Ovaprim
	825	5	.78	M	Ovaprim
	847	5.5	.78	M	Ovaprim
		4.5			
		034			

Bioensayo No 6.-

Desarrollo Acuicola El Huasteco el Huasteco.-

Se realizo durante la cuarta semana de Julio del 2006 y se aplicaron los siguientes tratamientos

Tratamiento1.-(Des Ala 6) 35 µg/Kg, en 1 hembra(peso y talla promedio 20 Kg y 1.47m) y 3 machos (peso y talla promedio tratados con Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg)

(dos repeticiones)

Tratamiento2.- (Implante de Ovaprim) en 1 hembra (peso y talla promedio 16.2Kg y 1.29 m) y 3 machos(peso y talla promedio 5.25 y .81m) con Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) (dos repeticiones)

Tratamiento3.- Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) en 1 hembra (peso y talla promedio 9Kg y 1.06m) y la misma dosis aplicada a tres machos(peso y talla promedio 4.5 y .79 m (dos tratamientos)

XV Bioensayo 6 tratamiento Desarrollo. Acuícola El Huasteco

ESTANQUE	No CHIP	PESO Kg	Long	SEXO	TRATAMIENTO
1 Temp 29°	282	22	1.44	H	Des Ala
	866	11	1.13	M	Ovaprim
	769	5	.78	M	Ovaprim
	833	6	.85	M	Ovaprim
2 Temp31°	5883	18	1.51	H	Des Ala
	845	10	.82	M	Ovaprim
	015	5.5	.88	M	Ovaprim
	568	5	.80	M	Ovaprim
3 Temp 31°	618	17	1.32	H	Implante Ov
	099	6	.85	M	Ovaprim
	111	5.5	.89	M	Ovaprim
	365	5	.80	M	Ovaprim
4 Temp 30°	807	15.5	1.27	H	Implante Ov
	882	5	.76	M	Ovaprim
	2181	5	.83	M	Ovaprim
	314	5	.78	M	Ovaprim
5 Temp 30°	613	8	.96	H	Ovaprim
	638	5	.83	M	Ovaprim
	600	5.5	.77	M	Ovaprim
6 Temp 30°	321	10	1.16	H	Ovaprim
	575	3	.81	M	Ovaprim
	825	5	.78	M	Ovaprim
	847	4	.78	M	Ovaprim
		7			

Bioensayo No 7.-

Laboratorio Ecofisiología UANL

Se realizo durante la segunda semana de Oct del 2003 y se aplicaron los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1.-(Des Ala 6) 35 μg /kg en 1 hembra (peso y talla promedio 4.6 Kg y 0.78m) y 2 machos (peso y talla promedio 2.8Kg y 0.67 m) tratados con Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) (dos repeticiones)

Tratamiento 2.- (Implante de Ovoplan) en 1 hembra (peso y talla promedio 4Kg y 0.70 m) y 2 machos(peso y talla promedio 2.7 y .67m) con Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) (dos repeticiones)

Tratamiento 3.- Des Gly 10 –(Des –Ala 6) inyectado (0.5 μg /kg) en 1 hembra (peso y talla promedio 3.75Kg y .72 m) y la misma dosis aplicada a dos machos (peso y talla promedio 2.5Kg y .63m) (dos repeticiones)

XVI Bioensayo 7 tratamiento Lab Ecofisiología de la UANL

ESTANQUE	No CHIP	PESO Kg	Long	SEXO	TRATAMIENTO
1 Temp 21°	4613	5 Kg	.80m	H	Des Ala
	4847	3 Kg	.72m	M	Ovaprim
	7575	2.3Kg	.63m	M	Ovaprim
2 Temp21°	9600	4.3Kg	.78m	H	Des Ala
	0638	3.5Kg	.68m	M	Ovaprim
	5782	2.5Kg	.65m	M	Ovaprim
3 Temp 21°	3099	4 Kg	.73m	H	Implante Ov
	3809	2.7 Kg	.68m	M	Ovaprim
	3297	2.5 Kg	.72m	M	Ovaprim
4 Temp 21°	9825	4 Kg	.68m	H	Implante Ov
	1782	2.8Kg	.67m	M	Ovaprim
	3575	3 Kg	.61m	M	Ovaprim

5 Temp 21°	4365	4.5 Kg	.70m	H	Ovaprim
	2281	3 Kg	.63m	M	Ovaprim
	1009	2.6Kg	.67m	M	Ovaprim
6 Temp 21°	2882	3 Kg	.65m	H	Ovaprim
	2568	2.5Kg	.60m	M	Ovaprim
	5779	2.7kg	.62 m	M	Ovaprim

Bioensayo No 8.-

Laboratorio Eco fisiología UANL

Se realizo durante la primera semana de Oct del 2004 y se aplicaron los siguientes tratamientos

Tratamiento 1.-(Des Ala 6) 35 µg/kg en 1 hembra (peso y talla promedio 5.2 Kg y .83.m) y 2 machos (peso y talla promedio 3.2Kg y 0.72 m) tratados con Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) (dos repeticiones)

Tratamiento 2.- (Implante de Ovoplan) en 1 hembra (peso y talla promedio 4.7 Kg y .78 m) y 2 machos (peso y talla promedio 3.5Kg y .70m) con Ovaprim inyectado (0.5 ml/Kg) (dos repeticiones)

Tratamiento 3.- Des Gly 10 –(Des –Ala 6) inyectado (0.5 µg/kg) en 1 hembra (peso y talla promedio 4.2 Kg y .76 m) y la misma dosis aplicada a dos machos(peso y talla promedio 3.07Kg y 0.66 m) (dos repeticiones)

XVII Bioensayo 8 tratamiento Lab Eco fisiología de la UANL

ESTANQUE	No CHIP	PESO Kg	Long	SEXO	TRATAMIENTO
1 Temp 21°	4613	5.4 Kg	0.84m	H	Des Ala
	4847	3.2 Kg	0.80m	M	Ovaprim
	7575	3 Kg	0.70m	M	Ovaprim
2 Temp21°	9600	5Kg	0.82m	H	Des Ala
	0638	3.7Kg	0.73m	M	Ovaprim
	5782	2.9Kg	0.68m	M	Ovaprim

3 Temp 21°	3099 3809 3297	4.5 Kg 3.3 Kg 2.8 Kg	0.82m 0.71m 0.75m	H M M	Implante Ov Ovaprim Ovaprim
4 Temp 21°	9825 1782 3575	5 Kg 3.3Kg 3.2Kg	0.75m 0.70m 0.65m	H M M	Implante Ov Ovaprim Ovaprim
5 Temp 21°	4365 2281 1009	4.7Kg 3.2 Kg 2.9 Kg	0.80m 0.65m 0.71m	H M M	Ovaprim Ovaprim Ovaprim
6 Temp 21°	2882 2568 5779	3.8Kg 3 Kg 3.2kg	0.72m 0.63m 0.68m	H M	Ovaprim Ovaprim Ovaprim

RESULTADOS

XVIII Bioensayo 1 tratamiento 1 Resultados

No CHIP	PESO	TALLA	SEXO	TRATAMIENTO	RESULTADO
039873591	26 Kg	1.62m	H	*Des Ala 6 (35µg/Kg)	
039602576	16 Kg	1.32m	H	*Des Ala 6 (35µg/Kg)	*Desove positivo 70% viabilidad

XIX Bioensayo 1 tratamiento 2 Resultados

No CHIP	PESO	TALLA	SEXO	TRATAMIENTO	RESULTADO

039872805	18 Kg	1.52m	H	**Pituitaria de Salmon (12 µg/Kg)	Desove negativo
040049357	13 Kg	1.26m	H	**Pituitaria de salmon (12 µg/Kg)	Desove negativo

XX Bioensayo 1 tratamiento 3 Resultados					
LUGAR	No H	Peso Talla	Tratamiento	Dosis	Resultado
Centro Acuicola TANCOL	2	12Kg 1.05m	Ovaprim	0.5ml/Kg	Desove Negativo
		13Kg 1.26m			

XXI Bioensayo 1tratamiento 4 Resultados

LUGAR	No H	Peso Talla	Tratamiento	Dosis	Resultados
Centro Acuicola TANCOL	2	7Kg 1.10m 12Kg 0.95m	Suero fisiológico	0.5ml/Kg	Desove negativo

**XXII Bioensayo 2 tratamiento Desarrollo Acuicola El Huasteco
Resultados**

LUGAR	No Chip Sexo H	Peso Talla	Tratamiento	Dosis	Resultado
Granja Acuicola El Huasteco	2845	1.8Kg	Des Ala 6	35 µg/kg	Desove Negativo
	4613	1.30m		35 µg/kg	Desove Negativo
	3809	4.2Kg		35 µgg/kg	Desove Negativo
		0.90m			
	5.4Kg				
	0:96m				

XXIII Bioensayo 3 tratamiento Desarrollo Acuicola El Huasteco Resultados					
LUGAR	No Chip Sexo H	Peso Talla	Tratamiento	Dosis	Resultados Desove
Granja Acuicola El Huasteco	282	18Kg 1..25m	Ovaprim	.5ml/Kg	Desove Positivo

XIV Bioensayo 5 Desarrollo Acuicola Huasteco					
LUGAR	No Chip H	Peso Talla	Trat.	Dosis	Resultado DESOVE
Granja Acuicola El Huasteco	282	19.7Kg 1.25m	Ovaprim	0.5ml/Kg	Positivo
	882	16.5Kg 1.12m			Negativo
	883	15Kg 1.48m			Negativo
	618	15.3Kg 1.25m1			Desove negativo

XXV Bioensayo 5 tratamiento El Huasteco Resultados

ESTANQUE	No CHIP	PESO Kg	Long	SEXO	TRATAMIENTO	RESULTADO DESOVE Y % ECLOSION
1 Temp 29°	282 866 769 833	24.5 12 5 6	1.44 1.13 0.78 0.85	H M M M	Des Ala 35 µg/kg Ovaprim Ovaprim Ovaprim	Negativo
2 Temp 31°	5883 845 015 568	18 11.5 6 5.5	1.51 0.82 0.88 0.80	H M M M	Des Ala 35 µg/kg Ovaprim Ovaprim Ovaprim	Positivo 18%
3 Temp 31°	618 099 111 365	17 6 7 4.5	1.32 0.85 0.89 0.80	H M M M	Implante Ov Ovaprim Ovaprim Ovaprim	Desove huevos no fertilizados
4 Temp 30°	807 882 2181 314	16 5.3 5	1.27 0.76 0.83 0.78	H M M M	Implante Ov Ovaprim Ovaprim Ovaprim	Positivo 27%
5 Temp 30°	613 638 600	8 5.5 5.5	0.96 0.83 0.77	H M M	Ovaprim Ovaprim Ovaprim	Positivo 17%
6 Temp 30°	321 575 825 847	13- 5 5.5 4.5	1.16 0.81 0.78 0.78	H M M M	Ovaprim Ovaprim Ovaprim Ovaprim	Positivo 55%

XXVI Bioensayo 6 tratamiento El Huasteco Resultados

ESTANQUE	No CHIP	PESO Kg	Long	SEXO	TRATAMIENTO	RESULTADO DESOVE
1 Temp 29°	282	24.5	1.44	H	Des Ala 35 µg/kg	Positivo Huevo no Fertilizado Desove incipiente
	866	12	1.13	M	Ovaprim	
	769	5	0.78	M	Ovaprim	
	833	6	0.85	M	Ovaprim	
2 Temp 31°	5883	18	1.51	H	Des Ala 35 µg/kg	Positivo Huevo no Fertilizado Desove incipiente
	845	11.5	0.82	M	Ovaprim	
	015	6	0.88	M	Ovaprim	
	568	5.5	0.80	M	Ovaprim	
3 Temp 31°	618	17	1.32	H	Implante Ov	Positivo Huevo no Fertilizado Desove incipiente
	099	6	0.85	M	Ovaprim	
	111	7	0.89	M	Ovaprim	
	365	4.5	0.80	M	Ovaprim	
4 Temp 30°	807	16	1.27	H	Implante Ov	Negativo
	882	5.3	0.76	M	Ovaprim	
	2181	5	0.83	M	Ovaprim	
	314		0.78	M	Ovaprim	
5 Temp 30°	613	8	0.96	H	Ovaprim	Positivo Huevo no Fertilizado Desove incipiente
	638	5.5	0.83	M	Ovaprim	
	600	5.5	0.77	M	Ovaprim	
6 Temp 30°	321	13-	1.16	H	Ovaprim	Negativo
	575	5	0.81	M	Ovaprim	
	825	5.5	0.78	M	Ovaprim	
	847	4.5	0.78	M	Ovaprim	

XXVII Bioensayo 7 Lab Ecofisiologia de la UANL Resultados

ESTANQUE	No CHIP	PESO Kg	Long	SEXO	TRATAMIENTO	RESULTADO S DESOVE
1 Temp 21°	4613 4847 7575	5 Kg 3 Kg 2.3Kg	0.80m 0.72m 0.63m	H M M	Des Ala 35 µg/kg Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
2 Temp21°	9600 0638 5782	4.3Kg 3.5Kg 2.5Kg	0.78m 0.68m 0.65m	H M M	Des Ala 35 µg/kg Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
3 Temp 21°	3099 3809 3297	4 Kg 2.7 Kg 2.5 Kg	0.73m 0.68m 0.72m	H M M	Implante Ov Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
4 Temp 21°	9825 1782 3575	4 Kg 2.8Kg 3 Kg	0.68m 0.67m 0.61m	H M M	Implante Ov Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
5 Temp 21°	4365 2281 1009	4.5 Kg 3 Kg 2.6Kg	0.70m 0.63m 0.67m	H M M	Ovaprim Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
6 Temp 21°	2882 2568 5779	3 Kg 2.5Kg 2.7kg	0.65m 0.60m 0.62 m	H M M	Ovaprim Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO

XXVIII Bioensayo 8 Lab Ecofisiología de la UANL Resultados

ESTANQUE	No CHIP	PESO Kg	Long	SEXO	TRATAMIENTO	RESULTADOS DESOVE
1 Temp 21°	4613 4847 7575	5.4 Kg 3.2 Kg 3 Kg	0.84m 0.80m 0.70m	H M M	Des Ala 35 µg/kg Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
2 Temp21°	9600 0638 5782	5Kg 3.7Kg 2.9Kg	0.82m 0.73m 0.68m	H M M	Des Ala 35 µg/kg Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
3 Temp 21°	3099 3809 3297	4.5 Kg 3.3 Kg 2.8 Kg	0.82m 0.71m 0.75m	H M M	Implante Ov Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
4 Temp 21°	9825 1782 3575	5 Kg 3.3Kg 3.2Kg	0.75m 0.70m 0.65m	H M M	Implante Ov Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
5 Temp 21°	4365 2281 1009	4.7Kg 3.2 Kg 2.9 Kg	0.80m 0.65m 0.71m	H M M	Ovaprim Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO
6 Temp 21°	2882 2568 5779	3.8Kg 3 Kg 3.2kg	0.72m 0.63m 0.68m	H M M	Ovaprim Ovaprim Ovaprim	NEGATIVO

DISCUSION

Los primeros intentos de inducción con el lote de reproductores recién constituido, en Julio del 2003, muy probablemente resultaron infructuosos debido a la edad de los reproductores. En efecto, el promedio de edad de los juveniles que se prepararon como reproductores era en ese momento de 3 años, lo cual contrasta ampliamente con el promedio de edad de las hembras del Centro Acuícola Tancol que en se mismo periodo era de aproximadamente 15 años, con algunas hembras de hasta treinta años entre la población y que con estas se han alcanzado producciones de hasta 400,000 larvas en una temporada natural. En este sentido, y a pesar de la carencia de datos para el catán en particular, existen reportes para otros lepisosteidos (*L. osseus*) que, basados en observaciones del medio

natural, señalan que la edad en la que se observan las primeras señales reproductivas de los machos es de 3 a 4 años, mientras que las hembras maduran hasta los 6 años (Netch y Witt, 1962). Por otra parte, existen registros de hembras en el medio natural de hasta 52 años, aunque se desconoce su viabilidad reproductiva (Ferrara, 2001). De la misma manera, se puede interpretar la carencia de efecto de los tratamientos aplicados a los jóvenes reproductores en las instalaciones de la FCB en el 2003 y 2004. Aunque en este caso, se suma el efecto de las bajas temperaturas en esos años en Monterrey (21-22°C) y el reducido espacio en el que fueron mantenidos. Lo anterior contribuye a explicar el éxito que se obtuvo en el bioensayo de Octubre del 2003 en la Granja el Huasteco, el cual se realizó con ejemplares de aproximadamente 10 años (hembra de 18 Kg y 1.25 m y machos con un peso promedio de 8.5 Kg y 1.12 m) que fueron capturadas en el Estado de SLP. De la misma manera se puede explicar el éxito de la inducción obtenida en la misma fecha en el Centro acuícola Tancol.

El éxito de estas inducciones fuera de temporada es remarcable, particularmente por que en el mes de Octubre del 2003 se alcanzaron apenas 21°C en el Centro Acuícola Tancol y 23°C en la Granja el Huasteco. Esto es notable, ya que de acuerdo a lo que actualmente se conoce, los lepisosteidos desovan típicamente durante la primavera y principios del verano (Simon y Wallus, 1989). Durante este tiempo el desove tiene lugar de manera intermitente, por lo que se considera que solo son 6 o 7 días efectivos durante la temporada (Dean, 1895).

Dentro de los casos más documentados se encuentra el del pejelagarto (*A. tropicus*), para el cual se ha observado, en el Río San Pedro, que de marzo a octubre una parte importante de la población de machos y hembras se encuentran en estado de madurez avanzado. En esta localidad se lograron localizar de manera aislada ejemplares maduros en diciembre y

febrero. Esto sugiere un potencial de reproducción permanente, con un período de reproducción más intenso de Abril a Septiembre (Chávez-Lomelí, 1989). Esto coincide con las observaciones de Gómez (1987) quien señala que la temporada de desove inicia en Mayo y finaliza en Septiembre. Dentro de este rango, Resendez y Salvadores (1983) mencionan que la maduración gonádica inicia en Abril, y ya para Junio se aprecian organismos bien maduros, a punto de desovar. El desove ocurre en los meses de Agosto y Septiembre. En concordancia con lo anterior Pérez-Sánchez (1995) señala que la temporada reproductiva de esta especie va de junio a agosto. En contraste, en el Lago Taxoma se reporta un corto período de reproducción para *L. oculatus* y para *L. osseus*, que va de mediados de Abril a finales de Mayo, observándose pocos o ningún desove en las primeras semanas de Junio (Echelle y Roggs, 1972). De cualquier manera el pico de desoves se sitúa en el mes de Mayo y es precedido por una elevación en la temperatura del agua. Los desoves se observaron a temperaturas de 68 a 86 °F (20-30°C). Estas observaciones divergen de las de Holloway (1954), quien observó que la temporada reproductiva de *L. platyrhincus* comenzaba a principios de mayo y se prolongaba hacia finales de septiembre. Sin embargo se señala que el pico de desoves se sitúa en Julio y Agosto, y que solo aquellos organismos que no alcanzaron a desovar en agosto lo hicieron en septiembre. Mientras que los desoves de *L. osseus* se enmarcaban dentro de un periodo comprendido entre Abril y Julio.

La extensión de los períodos reproductivos parecería estar en relación con la latitud y por supuesto con la temperatura. En este sentido, Suttkus (1963) menciona que el desove siempre se lleva a cabo en agua dulce durante un breve período de la mitad de Mayo a la mitad de Junio en la latitud de Nueva York. Por su parte, Breder y Rosen (1966) reportan que el período de máxima actividad sexual de *L. platostomus* se presenta en Julio.

Un dato que viene a confirmar la suposición anterior, es el emitido por Morales (1987), quien describe que los catanes (*A. spatula*) desovan cuando la temperatura promedio del agua se eleva por encima de los 27°C, misma que en la parte sur de Tamaulipas se alcanza en los meses de mayo a junio. Por otra parte, es notable la preferencia térmica de las especies, ya que en el caso del manjuarí (*A. tristoechus*) en Cuba, la temporada de reproducción va de mayo-junio (León *et al.* 1978) cuando se presentan temperaturas que oscilan entre los 24 y 30°C y al parecer la hora y la luminosidad no importan.

De acuerdo a Dean (1895), la temperatura del agua es el factor más determinante sobre la temporada de desove. La temperatura de las aguas menos profundas, donde el desove tiene lugar en Carolina del Sur, oscila entre los 66-70°F (19-21°C). Este mismo autor señala que la temperatura del aire en conjunto con fuertes vientos y lluvias, no tiene un efecto inmediato sobre la temporada de reproducción. Sin embargo, existen argumentos que indican que la lluvia tiene efectivamente cierta repercusión sobre la temporada de desove. Así, se ha sugerido que es importante que crezca el niveles del agua en las zonas inundables, con el fin de que la maleza sirva como sustrato para los huevos adheribles. Igualmente, se ha postulado una cierta sincronía en relación con la aparición de zooplancton con las lluvias, esta producción se favorecería por el efecto de la putrefacción de los pastos, contribuyendo así a fertilizar el sistema. Esto sin duda aseguraría la viabilidad de las futuras larvas. A este respecto, Pérez-Sánchez (1995), menciona que la ocurrencia de los desoves depende de factores ambientales tales como la precipitación pluvial y la consecuente inundación de zonas aledañas a ríos y lagunas, lo que propicia el incremento de poblaciones planctónicas de cladóceros y copépodos. En relación con esto, se ha señalado que en los peces tropicales intervienen otros factores, además del fotoperiodo y la temperatura, que definen la estacionalidad reproductiva asociada a la temporada de lluvias,

la cual está relacionada a su vez con la abundancia de alimento (Norris y Jones, 1987, citado por Pérez-Sánchez, *op cit*). Así mismo, se ha postulado que la lluvia ayuda a liberar y a dispersar los huevos adheridos al sustrato, ya que de otra manera perecerían (Breder y Rosen, 1966). En el mismo sentido, Simon y Wallus (1989), señalan que la temporada de reproducción *L. osseus* y de *L. platostomus*, que va de abril a junio, coincide con las inundaciones estacionales en las zonas pantanosas, las cuales están consideradas como hábitats importantes para el desove, especialmente considerando la disminución concomitante de éstos hábitats y las poblaciones de estas especies.

Los desoves subsecuentes (Junio, 2005, Mayo, 2006 y Julio 2006) se explican por las mismas razones: edad de los reproductores, alimentación, densidad de los reproductores y particularmente eficacia de las hormonas utilizadas. Sobre estos bioensayos vale la pena mencionar lo incipiente de los desoves y la ausencia de fertilización del último (Julio 2006). Esto indica que la cercanía de la inducción del desove precedente (Mayo, 2006), no permitió la regeneración de las gónadas de los reproductores en tan breve tiempo. Por otra parte, la variación en los porcentajes de eclosión se puede explicar en función de la variabilidad de las edades y tallas de los reproductores ya que para la constitución lote de reproductores se incluyeron tanto organismos cultivados como silvestres, y la edad de estos últimos es incierta. Igualmente, no se deben descartar las consecuencias de la manipulación excesiva durante la aplicación de las diversas inyecciones. A esto se puede agregar el factor genético, el cual se discute en otro capítulo.

El éxito reproductivo logrado es sin duda producto de las hormonas utilizadas, ya que se puede notar que tanto los testigos inyectados con suero fisiológico como los no inyectados nunca lograron desovar. Dentro de este contexto, las hormonas que mejor resultado dieron fueron la composición comercial Ovaprim y los factores liberadores de gonadotropinas.

La eficacia probada del Ovaprim ha sido demostrada en diversas especies (Pandey *et al*, 1998; Cheah *et al*, 2000; Kather Haniffa and Sridhar, 2002) y su actividad se explica en base a su composición. En efecto, a la gran potencia de los análogos sintéticos de factores liberadores de gonadotropinas se viene a sumar el enorme efecto del domperidone, un eficaz bloqueador de dopamina, la cual al no poder bloquear la síntesis y liberación de los factores liberadores endógenos, permitirá que estos fluyan internamente sumándose a los suministrados en la misma preparación (Nandeesha *et al*. 1990, Goudie *et al*. 1992). Adicionalmente, cabe señalar que la dosis suministrada (0.5 ml/Kg de masa corporal) cae dentro del rango promedio reportado por otros autores 0.3 ml/kg y 0.6 ml/kg (Nandeesha *et al.*, 1993; Francis, 1996; Haniffa *et al.*, 2000)

Sin embargo, el análogo sintético utilizado (Des-Ala6) se reveló eficaz, como se puede constatar en el primer bioensayo llevado a cabo en el Centro Acuícola Tancol en el 2003, aún comparado con el Ovaprim. En efecto es conocida la gran actividad liberadora hipotalámica localizada en los núcleos preópticos.

Se han aislado varias formas de GnRH en peces: sGnRh del salmón *Onchorhynchus keta* (Sherwood *et al*. 1983), IGnRh I y la IGnRH II de la lamprea *Petromyzon marinus* (Sherwood *et al*. 1986), cfGnRH del pez gato *Clarias macrocephalus*, dfGnRH de *Squalus acanthias* (Lovejoy, Fischer, y Ngamvongchon 1992), sbGnRH de la brema *Sparus aurata* (Powell, Reska-Skinner, y Prakash 1994), pjGnRH del pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Montaner, Park, y Fischer 2001), de *Coregonus cupleaformis* (Adams, Vickers, y Warby 2002) y en pleuronectiformes que es muy similar al de la brema y el salmón (Weltzien *et al*. 2004)

Las hormonas liberadoras hipotalámicas de peces óseos son deca péptidos y la secuencia de los aminoácidos es muy parecida entre ellos y a los de otros vertebrados (tiburones,

reptiles y aves y difieren con anfibios y mamíferos). Algunos autores mencionan que es debido a que estas hormonas tienen una actividad biológica similar (Breton *et al.* 1984; Breton, Weil, y Jalabert 1972; Eckert, Randal, and Augustine G. 1989) lo que indica que existe poca especificidad por parte de éstas. Se han sintetizado análogos estructurales de estas hormonas liberadoras con un efecto mucho más potente que las originales.

Actualmente se sabe que los GnRH son al menos 7 miembros en la familia con distintas estructuras proteicas. Seis de estas estructuras son conocidas por estar presentes en varias especies de peces. La más amplia distribución de estas 7 formas de GnRH aparece en el GnRH-II de pollo la cual es encontrada desde peces cartilagosos hasta en marsupiales. Otra forma altamente conservada es el GnRH de mamíferos, está presente en peces oseos primitivos anguilas, anfibios y mamíferos . El GnRH-I de salmon fue aislado y secuenciado de extractos hipotalámicos de *Oncorhynchus keta*, pero evidencias indirectas sugieren que está presente en otros peces teleósteos. El GnRH-I de pollo fue aislado y secuenciado solo en formas de aves y reptiles. El GnRH dogfish (*Squalus acanthias*), bagre (*Ictalurus punctatus*) y lampreas (*Petromyson marinus*) han sido identificadas a la fecha solamente de los en peces de los que toman su nombre. Todas las siete formas de GnRH actúan in vitro para liberar gonadotropinas obtenidas de fragmentos de pituitaria de goldfish y cinco formas fueron probadas en vivo para inducir la ovulación de al menos una de varias especies de peces .

Los resultados de la inducción señalan que las hormonas análogas de factores liberadores de gonadotropinas, Ovaprim y D-Ala⁶-LHRHa pueden ser empleados como agentes inductores del desove en *A. spatula*. La selección de este análogo en particular se estableció en el modelo fisiológico experimental basado en el pejelagarto (*A. tropicus*)

(Hernández-Vidal, 2002). La carencia de desoves en los organismos de los grupos control valida ampliamente estos resultados.

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 maduración (Weber *et al.*, 2000).

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 maduración (Mylonas *et al.*, 1992).

Considerando lo anterior, la temporada de desoves de *A. spatula* en cautiverio pudo ampliarse a casi seis meses (mayo-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 final), según nuestra experiencia con la especie.

CAPITULO 3

EVALUACIÓN DE LA MADUREZ SEXUAL

Antecedentes

Técnicas para la cuantificación de la Vitelogenina

Para la cuantificación de la vitelogenina se emplean los métodos llamados indirectos, en los cuales se toma como referencia la cantidad de alguna molécula relacionada con la vitelogenina para extrapolarla a la cantidad de esta última; también se emplean métodos directos o los llamados inmunoensayos, en los cuales se producen anticuerpos específicos para la vitelogenina o la lipovitelina y se realizan pruebas tanto de detección como de cuantificación.

Métodos Indirectos

Uno es la medición de una Proteína Ligada al Fósforo Alkali-Inestable encontrada en el plasma de hembras maduras. El método se basa en el contenido de fósforo de la vitelogenina y su distribución limitada a las hembras vitelogénicas, por lo que pueden ser identificadas por la presencia en el plasma de una proteína ligada a fósforo en abundancia, la cual es detectada por su sensibilidad al álcali (Craik y Harvey, 1984; Nagler *et al.*, 1987). Dentro de las desventajas de este método se encuentra el hecho de que al detectar fósforo en la muestra puede ser que no forme parte de la vitelogenina; además la cantidad de fósforo que contiene la vitelogenina varía considerablemente de una especie a otra, por lo que su concentración no se puede extrapolar a la concentración de vitelogenina sin conocer el contenido de fósforo de la misma; para llevarlo a cabo se requieren de grandes cantidades de plasma para distinguir entre sexos en individuos inmaduros y en general es menos sensible que los métodos inmunológicos (Craik y Harvey, 1984; Rinchard *et al.*, 1997).

Otro método es la determinación de la cantidad de calcio en plasma, que al igual que el fósforo está relacionado con la aparición de la vitelogenina en el torrente sanguíneo. Sin embargo, en algunas especies se ha demostrado que si bien existe una correlación positiva entre los niveles de calcio y vitelogenina, ésta sólo se presenta cuando hay una alta concentración de vitelogenina en la sangre, por lo que este método sólo puede ser usado para detectar los niveles de vitelogenina en las etapas avanzadas de la vitelogénesis (Nagler *et al.*, 1987; Tyler y Sumpter, 1990a). Ésta técnica es igualmente variable de especie a especie.

Inmunoensayos

La Inmunodifusión Radial Simple o SRID, por sus siglas en inglés, es un método cuantitativo ampliamente aplicado al estudio de anticuerpos y a la detección y cuantificación de antígenos solubles. En éste, uno de los componentes del sistema antígeno-anticuerpo (generalmente el anticuerpo) es incorporado en un gel de agar en su fase líquida, para posteriormente dejarlo solidificar en una superficie horizontal nivelada. Las moléculas en solución son puestas en pozos hechos en el gel una vez que está sólido, y se difunden radialmente combinándose con el anticuerpo o antígeno complementario, dando lugar a una precipitación en forma de anillo, después de un determinado tiempo la difusión cesa. Las áreas cubiertas por la inmunoprecipitación son examinadas ya sea directamente o después de una tinción. El diámetro de dicho anillo se relaciona con la cantidad de antígeno o anticuerpo en solución (Clausen, 1988; Catty y Raykundalia, 1989). Este método se ha utilizado para medir los niveles de vitelogenina en diferentes especies de peces (Hiramatsu *et al.*, 1997; Fujita *et al.* 1998; Hoque *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2000) incluyendo *A. tropicus*, especie relacionada con el catán (Hernández, 2002).

El método de Rocket Inmunolectoforesis (RIE) fue desarrollado por la combinación de los principios de electroforesis e inmunoprecipitación y permite la estimación de una concentración de antígeno por la reacción con un anticuerpo específico. El antígeno es aplicado en pozos hechos en el gel, que contiene el anticuerpo específico inmovilizado, y es obligado a migrar por una corriente eléctrica a través del agar, resultando en picos de precipitación (rockets), cuya área es proporcional a la concentración del antígeno (Clausen, 1988; Catty y Raykundalia, 1989). Este método se ha utilizado para cuantificar la vitelogenina en *Salmo gairdneri* (Maitre *et al.*, 1985).

El Radioinmunoensayo (RIA) también ha sido utilizado para cuantificar diferentes moléculas, logrando medir la cantidad de un antígeno utilizando un isótopo radioactivo con el cual se marca el antígeno o el anticuerpo complementario, lo que permite no sólo detectar su presencia, sino cuantificarlo. Este método es muy utilizado debido a su sensibilidad (Copeland *et al.*, 1986; Copeland y Thomas, 1988; Norberg y Haux, 1988; Benfey *et al.*, 1989; Tyler y Sumpter, 1990b).

El ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es un inmunoensayo basado en el mismo principio que el RIA, con la diferencia de que en el primero se utiliza una enzima para marcar el antígeno o el anticuerpo. Las ventajas con respecto al RIA es que los materiales no son peligrosos y tienen un mayor tiempo de vida-anaquel. Otra consideración es el costo, que en el RIA es muy grande comparado con el ELISA en cuanto a instrumentación necesaria para cuantificar la radioactividad, esto sin tomar en cuenta los desechos radioactivos que resultan (Clark y Engvall, 1987; Specker y Anderson, 1994). Otra de las ventajas es que las enzimas usadas para marcar los anticuerpos o los antígenos dan un color típico y son fácilmente

detectables (Clausen, 1988). Adicionalmente, en este método se utilizan cantidades mínimas, tanto de los reactivos como de los anticuerpos y muestras a ensayar.

Existen diferentes tipos de ELISA, que en general se clasifican como ensayos Competitivos y No Competitivos, la diferencia entre ellos depende de que el antígeno a medir compita por un número limitado de sitios de unión, o si sólo es puesto a reaccionar con un exceso de anticuerpo y el excedente de la reacción antígeno-anticuerpo es medido en un segundo paso (Clark y Engvall, 1987; Specker y Anderson, 1994).

ELISA Competitivo

En este tipo de ELISA, una cantidad conocida del antígeno es absorbido en la microplaca. Posteriormente, una cantidad conocida de anticuerpo, marcado o no con una enzima, y una cantidad variable del antígeno (presente en muestras o como parte de una curva estándar) son incubados en la microplaca. Este método se considera competitivo ya que el anticuerpo se une al antígeno en solución o al antígeno inmovilizado dependiendo de las cantidades de antígeno presente en la muestra o en la curva. Así, con altos niveles presentes en la solución, la mayoría de los anticuerpos se unirán al antígeno en solución y solo una mínima cantidad se unirá a la microplaca. Después de un lavado apropiado, el sustrato de la enzima es añadido y el cambio de color es usado para cuantificar la cantidad de anticuerpo capturado por el antígeno de la microplaca. La concentración de anticuerpo será inversamente proporcional al antígeno en solución. La ventaja que ofrece es su sencillez (implica pocos pasos), es capaz de medir pequeños y grandes antígenos, además de que requiere pequeñas cantidades de anticuerpo y si el anticuerpo está marcado sólo necesita de éste para el ensayo (Clark y Engvall, 1987; Clausen, 1988; Specker y Anderson, 1994). Para este método, existen dos variantes; la primera en “equilibrio”,

en la que el anticuerpo y el antígeno se incuban en la microplaca directamente; y la segunda en “no equilibrio”, en la que se lleva a cabo un paso de preincubación del anticuerpo y del antígeno en solución en tubos eppendorf, después de la cual el producto de esta reacción es incubado en la microplaca continuando con el procedimiento normal.

ELISA No Competitivo

En el ELISA tipo “Sándwich”, el anticuerpo primario es adherido a la microplaca; el antígeno (curva estándar o muestras) es incubado en los pozos para ser capturado por la capa de anticuerpo primario en cantidades proporcionales a las presentes en la solución. Después de un lavado apropiado, para remover el exceso de antígeno no adherido, un anticuerpo secundario marcado es incubado en la microplaca. Enseguida de una serie de lavados, el sustrato para la enzima es añadido y el grado del cambio de color es cuantificado. La cantidad de señal generada en el ensayo es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Esta variante de ELISA ofrece una alta sensibilidad debido al uso de dos anticuerpos diferentes, sin embargo, solo puede ser realizado con grandes antígenos multivalentes con múltiples epítopes (Clark y Engvall, 1987; Clausen, 1988; Specker y Anderson, 1994).

Tabla XXIX Relación de los tipos de ELISA empleados para cuantificar vitelogenina en diferentes especies de peces.				
AUTOR (AÑO)	ESPECIE	TIPO DE ELISA	TIPO DE ANTICUERPO	LÍMITE DE DETECCIÓN
Nuñez <i>et al.</i> (1989)	<i>Solea vulgaris</i>	Competitivo	Policlonal	12.5 – 1,600 ng VTG/ml
Cuisset <i>et al.</i> (1991)	<i>Acipenser baeri</i>	Competitivo	Policlonal	12.5 – 1,600 ng VTG/ml
Kishida <i>et al.</i> (1992)	<i>Morone saxatilis</i>	Competitivo	Policlonal	8 – 1,000 ng VTG/ml
Kishida y Speaker (1994)	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Competitivo	Policlonal	
Mañanós <i>et al.</i> (1994b)	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Competitivo	Policlonal	1 – 60 ng VTG/ml
Specker y Anderson (1994)	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Competitivo	Policlonal	4 – 1,000 ng VTG/ml
Bon <i>et al.</i> (1997)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Competitivo	Policlonal	20 – 320 ng VTG/ml
Hiramatsu <i>et al.</i> (1997)	<i>Hucho perryi</i>	No Competitivo "Sandwich"	Policlonal	10 – 1,000 ng VTG/ml
Heppell y Sullivan (1999)	<i>Mycteroperca microlepis</i> <i>Epinephelus striatus</i> <i>E. guttatus</i>	Competitivo	Policlonal (anti-VTG de <i>Mycteroperca microlepis</i>)	19 – 1,452 ng VTG/ml
Smeets <i>et al.</i> , (1999)	<i>Cyprinus carpio</i>	Competitivo	Policlonal (anti-VTG de <i>Carassius auratus</i>)	

Flammarion <i>et al.</i> (2000)	<i>Leuciscus cephalus</i>	Competitivo	Policlonal (anti-VTG de <i>Cyprinus carpio</i>)	
Asturiano <i>et al.</i> (2000)	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Competitivo	Policlonal	
Heppell y Sullivan (2000)	<i>Myxteroperca microlepis</i>	Competitivo	Policlonal	19 – 1,452 ng VTG/ml
Holbech <i>et al.</i> (2001)	<i>Danio rerio</i>	No Competitivo "Sandwich"	Policlonal (anti-lipovitelina)	0.2 – 20 ng VTG/ml
Susca <i>et al.</i> (2001)	<i>Thunnus thynnus</i>	Competitivo	Policlonal	2.4 – 1,250 ng VTG/ml
Schaufhauser-Smith y Benfey (2002)	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Competitivo	Policlonal	12 – 375 ng VTG/ml
Hennies <i>et al.</i> (2003)	<i>Cyprinus carpio</i> <i>Perca fluviatilis</i>	Competitivo	Policlonal	27 – 1,730 ng VTG/ml 40 – 960 ng VTG/ml
Mylchreest <i>et al.</i> (2003)	<i>Pimephales promelas</i>	Competitivo	Policlonal	3 – 200 ng VTG/ml

METODOLOGIA

Origen del material biológico

Se usaron ejemplares de catán (*Atractosteus spatula*) mantenidos en el Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., para obtener muestras de vitelogenina.

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Inducción de los Machos

Para obtener las muestras de plasma con vitelogenina, se indujeron dos catanes machos con β -estradiol (E8875-5G, Sigma). La dosis que se usó fue de 10mg/Kg de peso del ejemplar y se inyectaron vía intraperitoneal, mezclando el esteroide en una emulsión de aceite de hígado de bacalao. Como control, a un tercer ejemplar, se le inyectó la correspondiente cantidad de emulsión sin el β -estradiol (Tabla 4). Antes de cada inyección se tomó una muestra de sangre. Las inyecciones se llevaron a cabo de manera sucesiva cada 8 días hasta completar cuatro dosis, ocho días después de la última inyección se sacrificaron los ejemplares para obtener el plasma, de acuerdo al protocolo descrito por Hernández (2002).

Tabla XXX. Registro de los ejemplares inducidos.

Ejemplar	Peso (Kg)	Tratamiento
Control (C)	2.3	200 μ l de emulsión.
Inducido 1 (I ₁)	3.6	36 mg de β -estradiol en 240 μ l de emulsión
Inducido 2 (I ₂)	3.8	38 mg de β -estradiol en 250 μ l de emulsión

Obtención de Plasma

Las muestras de sangre, obtenidas de los machos inducidos, fueron transferidas a tubos de vidrio heparinizados. Se les agregó inmediatamente 60 μ l/ml (500 KUI/ml) del inhibidor de proteasas aprotinina (A-6012, Sigma), se mezclaron y después se centrifugaron a 5,000

rpm a 4°C por 30 min. Finalmente, se hicieron alícuotas del sobrenadante, las cuales se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta su uso.

Obtención de Mucus

Con la finalidad de detectar vitelogenina en el mucus de los animales inducidos se tomaron muestras para comprobar la presencia de esta molécula. Para su obtención se realizó un raspado en el cuerpo del animal con una espátula, el mucus se colocó en tubos de vidrio a los cuales se les agregó un volumen de PBS 0.1M, Tween 0.05% y 60 µl/ml de aprotinina. Los tubos se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron a 5,000 rpm por 30 min. a 4°C. Finalmente, se hicieron alícuotas con el sobrenadante y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Identificación de la Vitelogenina

Para verificar la presencia de la vitelogenina, durante el proceso de obtención y purificación, se prepararon geles de agarosa para identificar la molécula por inmunodifusión utilizando como estándar vitelogenina de *A. tropicus* y anticuerpos dirigidos contra esta molécula. Igualmente, se realizaron geles de poliacrilamida para identificar la molécula por su peso molecular y se llevaron a cabo Western Blots para comprobar que la banda cruzará con el anticuerpo.

Inmunodifusión

La presencia de la vitelogenina se comprobó por doble inmunodifusión de acuerdo al método de Ouchterlony (1949). Las pruebas se llevaron a cabo en placas de agarosa al 1% elaboradas sobre Gel-Bond (Pharmacia) en un buffer Tris-HCl 10mM, 0.1% de NaN₃, pH 7.3. Se depositaron 10 µl por pozo de las muestras tomadas durante la inducción de los ejemplares, mientras que en la línea central se colocaron 100 µl del suero de *A. tropicus*. Los geles se incubaron en una cámara húmeda a 37°C por 24 hrs. Después se lavaron con

una solución de NaCl al 0.14M durante 2 hrs. Posteriormente, se prensaron entre hojas de papel filtro y absorbente hasta que estuvieron completamente secos. Por último, las líneas de precipitación se revelaron con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% en etanol, ácido acético y agua destilada (proporción 40:10:50) durante 2 hrs. y como decolorante se utilizó la misma solución sin el colorante.

Electroforesis

Los geles de poliacrilamida se prepararon a una concentración del 6% en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se mezclaron 1:1 con un buffer conteniendo 50% de H₂O, 12.5% de Tris-Hcl 0.5M, pH 6.8, 10% de glicerol, 20% de SDS al 10%, 5% de 2-β-mercaptoetanol y 2.5% de azul bromofenol al 0.1% y se calentaron por 5 min en un baño maría (a 100°C). Los geles se corrieron con un buffer 0.02M Tris, 0.25M Glicina y 1% SDS pH 8.3 a 30 mA. Al finalizar la electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% en una solución de metanol, ácido acético y agua destilada (proporción 40:10:50) durante 20 minutos y como decolorante se utilizó la misma solución sin el colorante.

Western Blot

Los geles de policacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (N-8017, Sigma, poro 0.2 μm) con un buffer de 0.02M Tris, 0.25M Glicina y 20% metanol pH 8.3 a 250 mA por 1 hr. Al terminar la transferencia se bloqueó la membrana con una solución de PBS más 3% de leche descremada (Svelty, Nestle) toda la noche a 4°C, o durante 2 hrs. a 37°C. Enseguida, se incubó en 10 ml de una solución de PBS más leche descremada al 0.3% y 0.1 mg del anticuerpo (suero) de *A. tropicus* por 2 hrs. a 37°C. Después de la incubación se lavó 3 veces durante 10 min con una solución de PBS más Tween-20 al 0.05% y se procedió a incubar con el anticuerpo conjugado (HRP-Goat Anti-Rabbit IgG,

Zymed Laboratories) 1:10,000 en 10 ml de PBS-Tween-20 0.05% durante 2 hrs. a 37°C. Finalmente, y después de 3 lavados, la membrana se reveló con 10 ml. de PBS más 5 mg. de 3'3 diaminobencidina tetrahidroclorídrica (D5637, Sigma) y 100 µl de H₂O₂ 3%, se dejó en la solución en agitación hasta que se pudieron apreciar las bandas y finalmente se detuvo la reacción con 100 µl de HCl 6N.

PURIFICACIÓN DE LA VITELOGENINA

La purificación de la vitelogenina incluyó las siguientes etapas:

Filtración en Gel

Para llevar a cabo la filtración en gel se utilizó un cromatógrafo modelo Gradi-Frac (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) y una columna (XK/26) de 64 cm de altura con 289 ml de Sephacryl-300 HR (Pharmacia Biotech). La columna se equilibró con buffer Tris-HCl 0.02M, NaCl 0.8M, NaN₃ 0.1%, pH 8. Para la calibración de la columna se utilizaron las siguientes moléculas de referencia: β-amilasa (200,000 Da.), apoferritina (443,000 Da.), tiroglobulina (669,000 Da.) y azul dextran (2,000,000 Da.) (MW-GF-1000 Kit, Sigma).

Antes de la cromatografía, el inhibidor de proteasas PMSF (Research Organics) se agregó al buffer de columna hasta alcanzar 2mM de concentración final. La muestra se diluyó 1:1 con el buffer Tris-HCl 0.02M, NaCl 1.6M, NaN₃ 0.1%, pH 8. El volumen total de inyección fue de 1 ml. La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de 1.5 ml/min y se colectaron fracciones de 4 ml, las cuales fueron monitoreadas a 280 nm. Las fracciones obtenidas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida y se identificaron las que correspondían al pico de vitelogenina, con ellas se integró un “pool”, que se usó para el siguiente paso de la purificación.

Precipitación

Se siguió la técnica descrita por Wiley *et al.* (1979), con algunas modificaciones. A un volumen del “pool” se le agregaron 3 volúmenes de agua bidestilada (bH₂O) estéril, 4.8 volúmenes de EDTA (100mM, pH 8) y 1.92 volúmenes de MgCl₂ (0.5M). La solución se mezcló por inversión. Se obtuvo un precipitado al centrifugarlo a 20,000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se conservó y se le agregaron 6 volúmenes más de bH₂O, se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar en las condiciones ya descritas. Finalmente, el sobrenadante se desechó y la pastilla, correspondiente a 2 ml del pool inicial, se resuspendió en 1 ml de solución inyectable al 0.9% (suero fisiológico, PiSA) en el caso de la proteína que se iba a inyectar al conejo, y en 1 ml de PBS, NaCl 0.2M, PMSF 2mM para la proteína que se iba a destinar al siguiente paso de purificación.

Electroforesis y Electroelusión

Se hicieron geles preparativos de acrilamida al 6%, en las condiciones ya descritas, en los que se depositó el precipitado. El gel se corrió a 30 mA hasta que la muestra entró en el gel separador y posteriormente se aumentó a 40 mA hasta el final de la corrida.

Al terminar la corrida, una parte del gel se cortó para teñirlo e identificar la banda de interés y el resto se guardó en refrigeración. Una vez identificada la banda, se cortó en el gel no teñido.

Para purificar la proteína a partir del gel se llevó a cabo una electroelusión. La banda, previamente reducida en fragmentos, se depositó en una bolsa de diálisis con una jeringa. A la bolsa de diálisis se le agregaron 2 ml. de buffer Tris-glicina con SDS y PMSF 2mM, la bolsa se colocó en una cámara de electroforesis horizontal con el mismo buffer y la electroelusión se llevó a cabo a 20 mA por 3 hrs. Al finalizar, el sobrenadante de la bolsa de diálisis se pipeteó y se filtró para eliminar restos de acrilamida. Se le agregó PMSF 2mM al sobrenadante y se guardó en alícuotas a -20°C.

Caracterización de la Proteína

Se llevó a cabo la caracterización de la proteína parcialmente purificada de la siguiente manera:

a) Determinación del Peso Molecular. Con los resultados de la filtración en gel se realizó un análisis de regresión lineal, considerando el parámetro de elusión K_{av} y el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar.

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Donde V_o : Volumen muerto.

V_e : Volumen de elusión de la molécula.

V_t : Volumen total de la columna.

La determinación del peso molecular también se llevó a cabo mediante electroforesis, usando la movilidad relativa (R_f) de las proteínas.

$$R_f = \text{distancia de migración de la proteína} / \text{distancia total de la corrida}$$

Posteriormente, se graficó este parámetro en la abcisa y el logaritmo del peso molecular en la ordenada, con lo que se obtuvo una regresión lineal con las proteínas del marcador (MW-SDS-200 Kit, Sigma).

b) Determinación de Carotenoides. Se realizó un espectro de absorción del “pool” y de la proteína precipitada, con un espectrofotómetro (Genesys, Spectronic. Nueva Cork, E.U.), en un rango de longitudes de onda entre 300 y 700 nm.

Cuantificación de Proteínas

En todos los casos en que se requirió conocer la concentración de proteínas, ésta se determinó por el método de Bradford (1976) adaptado a microplacas. Se utilizó una curva estándar de 0.05 a 0.5 mg de BSA (A-9647, Sigma) por ml de agua destilada. De cada dilución y de las muestras se colocaron 10 μ l por pozo (con 2 repeticiones), más 200 μ l de solución de trabajo 85% de H_2O , 3% etanol al 95%, 6% ácido fosfórico al 88% y 6% de la solución stock de Bradford (100 ml de etanol al 95%, 200 ml de ácido fosfórico al 88% y 350 mg de azul de Coomassie G) se mezclaron dentro del lector por 2 min y finalmente se leyeron las placas a 620 nm en un lector de microplacas (Tecan, Sunrise, California, E.U.).

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Esquema de Inmunización

Los anticuerpos (anti-VTG) se generaron en un conejo macho de la raza Nueva Zelanda. Se tomó una muestra de sangre antes de la inyección de la molécula purificada. Se aplicaron un total de 4 inyecciones, efectuadas cada 21 días. La primera dosis fue de 37 μ g del precipitado más 800 μ l de adyuvante de Freund completo (F-5881, Sigma) por vía intramuscular, la segunda fue de 18 μ g del mismo precipitado más 500 μ l de adyuvante de Freund incompleto (F-5506, Sigma) por vía subcutánea, la tercera de 18 μ g del precipitado en forma intraperitoneal y subcutánea y la cuarta de 6 μ g del precipitado más 200 μ l de adyuvante completo vía subcutánea. Quince días después de la segunda inyección se tomó una muestra de sangre para observar la evolución de los anticuerpos. Quince días después de la tercera inyección se tomó otra muestra y ocho días después de la última inyección nuevamente se tomó una muestra para purificar los anticuerpos.

Las muestras de sangre se tomaron a nivel de la vena central de la oreja, se dejaron coagular por una hora a temperatura ambiente para después centrifugarlas a 3,500 rpm a

22°C por 5 minutos. Se hicieron alícuotas con el sobrenadante y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Purificación con Proteína A

Para la purificación de los anticuerpos se usaron las alícuotas previamente congeladas de la sangre extraída del conejo. Se utilizó una columna de 10 ml con proteína A Sepharosa CL-4B (Pharmacia), la cual fue inicialmente lavada con 5 volúmenes de buffer Ácido Acético 0.1N, NaCl 0.15M, pH 3 y después fue equilibrada con 5 volúmenes de buffer de fosfatos 0.1M, pH 8. Se aplicaron 2 ml del suero en la columna y se dejó eluir lentamente. La columna se lavó con el buffer de fosfatos pH 8, recuperando fracciones de 2 ml para monitorear la elusión de las proteínas a 280 nm. Cuando la densidad óptica bajó de 0.1, se eluyeron algunas Ig con un buffer de fosfatos 0.1M pH 7, para lo cual se tomaron igualmente fracciones de 2 ml y se esperó a que bajara la densidad óptica. Finalmente, se aplicó el buffer de disociación (ácido acético 0.1N, NaCl 0.15M, pH 3) y se colectaron fracciones de 2 ml en tubos conteniendo 300 µl de buffer Tris-HCl 1M, pH 9 para obtener el pico proteico con las inmunoglobulinas. Se reunieron las fracciones resultantes y se les agregó 0.05% (p/v) de NaN₃ y 50% (v/v) de glicerol. Finalmente, se hicieron alícuotas, las cuales se conservaron a -20 °C.

Actividad de los Anticuerpos

La producción y la purificación de los anticuerpos se verificaron mediante las siguientes pruebas:

a) Pruebas Cruzadas. La producción y el título de los anticuerpos se siguieron por inmunodifusión doble, de acuerdo al método de Ouchterlony (1949) antes descrito. Se depositaron 10 µl de diluciones seriales (1-1:16) del suero de conejo por pozo y en el centro

se colocaron, una muestra de la proteína purificada por electroelución, una del plasma de catán inducido y otra del “pool”.

b) Western Blot. Para comprobar que los anticuerpos obtenidos cruzaran con la banda de interés se realizó un Western Blot como se describió anteriormente, pero utilizando solo 20 µl del anticuerpo anti-VTG.

ELISA

El inmunoensayo que se implementó fue un ELISA competitivo, basado en el descrito por Specker y Anderson (1994), con algunas modificaciones. Se emplearon dos anticuerpos, el anticuerpo primario que se obtuvo con la vitelogenina purificada (anti-VTG) y el secundario fue un anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP-Goat Anti-Rabbit IgG, Zymed Laboratories).

La estandarización se basó en el protocolo general siguiente: se unió el antígeno (VTG) a la placa (Nalgene, Nunc) en 200 µl de buffer, incubándose toda la noche a 4°C. Posteriormente, se desechó el contenido de la placa por inversión y se lavaron los pozos con buffer PBS-Tween 1:1,000. Enseguida, se bloqueó con 200 µl de PBS conteniendo 5% de leche descremada (Svelty, Nestlé) y se incubaron las placas durante 2 hrs. a 37°C. Al término de la incubación, la solución fue desechada y se lavaron los pozos. Como paso siguiente, la competencia se llevó a cabo agregando 200 µl de buffer de dilución (PBS-Tween20 1:1,000 y 5% de leche descremada) conteniendo una mezcla, previamente incubada por 1 hr. a 37°C, de una cantidad fija de anticuerpo anti-VTG y diferentes cantidades de VTG, correspondientes a la curva estándar o las muestras. Para este efecto, se realizó una incubación por 1 hr. a 37°C, se desechó la solución y se lavaron nuevamente los pozos. El anticuerpo secundario se diluyó en 200 µl de PBS-Tween20 1:1,000 y 1% de leche descremada y se incubó por 1 hr. a 37°C, se desechó la solución y se lavaron los

pozos. Para revelar la reacción se utilizaron 100 µl del sustrato ortofenilendiamina (0663P-OPD, Research Organics) (10x OPD en buffer de citratos 1M, pH 4.5) y se incubó por 20 min a 37°C en oscuridad. Finalmente, la reacción se detuvo con 50 µl de HCl 1N y se leyó la placa a 492 nm en un lector de microplacas (Tecan, Sunrise Remote Control). Todos los lavados se realizaron agregando 200 µl de buffer de PBS-Tween 1:1,000, desechando el contenido por inversión y secando sobre servilletas de papel. El proceso se repitió cinco veces en cada ocasión.



Fig 16.-ELISA en equilibrio mostrando frecuencia de pasos para alcanzar la reaccion maxima

Los controles se trataron de la siguiente manera:

Blanco (Bl): En este caso se depositó sólo buffer de carbonatos (sin VTG), y después sólo buffer de dilución sin anticuerpos anti-VTG. Se consideró como punto de referencia (cero).



Fig 17.- Blanco Control

Máximo de la Curva (Bmax): En este caso se depositó VTG en el buffer de carbonatos, pero al momento de competir, sólo se depositó el anticuerpo primario sin VTG. La lectura fue considerada como el valor más alto de la curva (Figura 2).



Fig 18 .-Reacción Máxima

Estandarización

a) Buffer de Unión. La estandarización comenzó con la definición del buffer que se utilizaría para unir el antígeno a la placa. Para esto se utilizaron 3 soluciones a pH diferentes:

- Buffer de acetatos, ácido acético glacial, acetato de sodio, pH 5.
- PBS, 0.1M, pH 7.2. (0.14M NaCl, 1.5mM KH₂PO₄, 20mM Na₂HPO₄ y 3mM KCl)
- Buffer de carbonatos, 0.1M Na₂CO₃, 0.1M NaHCO₃, pH 9.6.

Se distribuyeron 200 µl de cada buffer, con 3 repeticiones, conteniendo 200 ng de VTG y se siguió el procedimiento arriba descrito, con la diferencia de que no se llevó a cabo una competencia, si no que se agregaron 200 µl del buffer de dilución conteniendo 1 µl del anticuerpo anti-VTG por pozo.

b) Concentraciones Óptimas. Una vez definido el buffer para unir el antígeno a la placa, se comenzaron las pruebas para buscar las cantidades óptimas de vitelogenina a unir en la placa, la del anticuerpo anti-VTG y la de anticuerpo secundario. Para esto se realizaron incubaciones con las combinaciones de las cantidades mostradas en la Tabla 5 y se siguió el procedimiento general, pero sin competencia. Una segunda prueba se realizó con los anticuerpos purificados combinando las cantidades como se muestra en la Tabla 6.

Tabla XXXI. Primera prueba de optimización de reactivos.

Ac. Sec.	Vitelogenina (ng)								
	50			100			200		
	Ac. anti-VTG			Ac. anti-VTG			Ac. anti-VTG		
1:10,000	1:200	1:2,000	1:20,000	1:200	1:2,000	1:20,000	1:200	1:2,000	1:20,000
1:20,000	1:200	1:2,000	1:20,000	1:200	1:2,000	1:20,000	1:200	1:2,000	1:20,000
1:40,000	1:200	1:2,000	1:20,000	1:200	1:2,000	1:20,000	1:200	1:2,000	1:20,000

Tabla XXXII. Segunda prueba de optimización de reactivos.

	Vitelogenina	
	50 ng.	100 ng.
Anticuerpo anti-VTG (ng)	2.5	2.5
	5	5
	7.5	7.5
	10	10
*Anticuerpo secundario 1:20,000		

c) Curva Estándar. Cuando se establecieron las cantidades óptimas y se obtuvo una densidad óptica entre 1 y 2 U, se llevó a cabo un ensayo con las diferentes cantidades de anticuerpo anti-VTG y una curva estándar con diluciones seriales de 300 a 1.5 ng de VTG. Se unieron 100 ng de VTG a la placa y después del bloqueo se realizó la competencia con las mezclas de las diluciones de la curva y las diferentes cantidades de anticuerpo anti-VTG (2.5, 5, 7.5 y 10 ng) previamente incubadas. Posteriormente, se siguió con el procedimiento general, incubando con el anticuerpo secundario en dilución 1:20,000.

Validación

Una vez establecidas las condiciones finales para el ELISA, se llevaron a cabo las pruebas para la validación del ensayo (Specker y Anderson, 1994), que consistieron en:

Sensibilidad: Se compararon 9 repeticiones del valor más bajo de la curva (1.5 ng) y 9 repeticiones del cero de la curva (B max) para saber si existían diferencias significativas, para lo cual se aplicó un análisis de t-student empleando el programa SPSS 11.0 para Windows (LEAD Technologies, Inc.).

Recuperación: A una muestra de plasma de macho, se le agregó una cantidad conocida de VTG y se calculó el porcentaje de recuperación:

$$\%R = 100(\text{cantidad observada}/\text{cantidad esperada})$$

Adicionalmente, a una muestra de plasma de un ejemplar inducido se le agregó la misma cantidad de VTG y se calculó:

$$\%R = 100(\text{cantidad observada}-\text{cantidad en la muestra})/\text{cantidad añadida}.$$

Paralelismo: Se calculó el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo de diferentes diluciones de una misma muestra en el mismo ensayo:

$$\%CV = 100(\text{desviación estándar}/\text{media}).$$

Reproductibilidad: Se calculó el coeficiente de variación (CV) inter-ensayo de las mismas diluciones de las muestras analizadas en diferentes ensayos.

Especificidad: Se analizaron dos muestras de pescado blanco (*Chirostoma estor*) diluidas 1:100; una de un macho y otra de una hembra.

Además, se realizó un análisis de paralelismo al comparar 4 curvas estándar con un método para detectar diferencias significativas entre líneas de regresión (Zar, 1996).

Finalmente, con el ELISA estandarizado, se analizaron las muestras de plasma y mucus, de los ejemplares inducidos y los mantenidos en el laboratorio. Las muestras se diluyeron 1:100, 500, 1,000, 5,000, 10,000 y 20,000. Para analizar los resultados, se cuantificó la proteína que contenía cada muestra y la cantidad de VTG obtenida en el ELISA se expresó como un porcentaje de la proteína total de la muestra.

Los resultados del ELISA se calcularon de acuerdo a la fórmula

$$\text{logit} = \text{Log}[(B/B_{\text{max}})/(1-B/B_{\text{max}})]$$

donde B es la Absorbancia menos el valor de la unión no específica (NSB).

A partir de los puntos de la curva estándar se estableció la regresión, y la cantidad de VTG en las muestras se calculó a partir de su logit de la misma manera usando los valores que quedaban dentro de la curva (Specker y Anderson, 1994).

Los resultados de las muestras, obtenidos con el ELISA, fueron analizados mediante un ANOVA para determinar las diferencias entre las 4 muestras del tratamiento de cada ejemplar. Al encontrarse diferencias significativas entre las cuatro semanas, éstas fueron separadas utilizando una prueba de comparación de medias de Duncan (Statgraphics Plus 5.1).

RESULTADOS

Obtención de la Vitelogenina

El seguimiento de la producción de VTG por inmunodifusión doble reveló la presencia de VTG a partir de la primera semana después de la inducción (Figura 5). Así mismo, se constató que no había reconocimiento de la proteína en el control (C). En las muestras de mucus sólo hubo reconocimiento hasta el final de la inducción. Cabe remarcar, que se apreciaron dobles líneas de precipitación en la mayoría de los pozos.

La electroforesis en poliacrilamida reveló la existencia de una banda de entre 150 y 205 KDa., que corresponde a la vitelogenina, pero sólo a partir de la segunda semana después de la inducción (Figura 6).

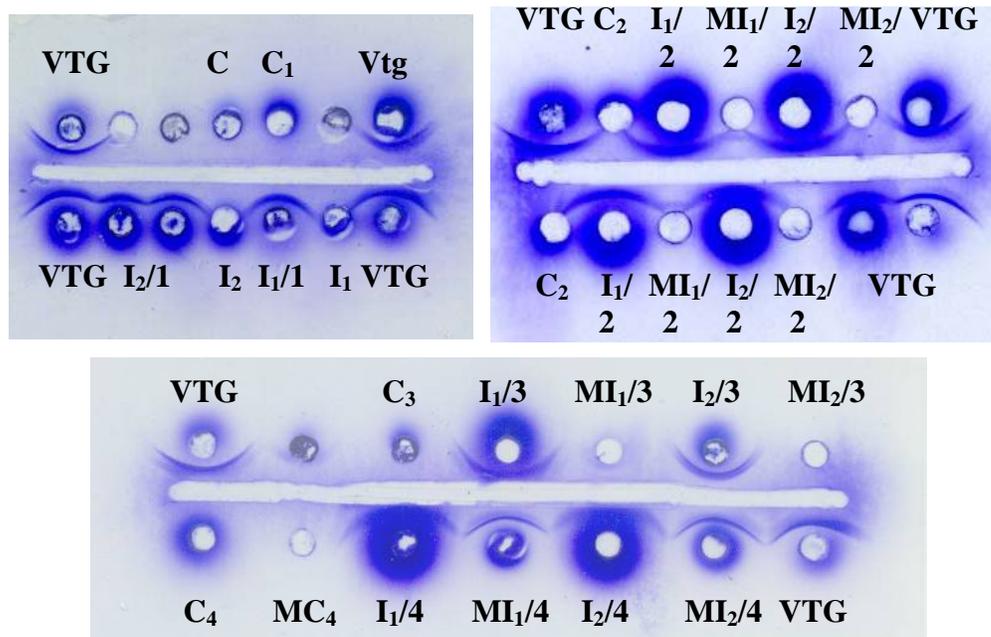


Figura 19. Inmunodifusión doble en geles de agarosa al 1% con las muestras de plasma y mucus obtenidas durante la inducción. VTG, vitelogenina y Ac, anticuerpos anti-VTG, ambos de *A. tropicus*.

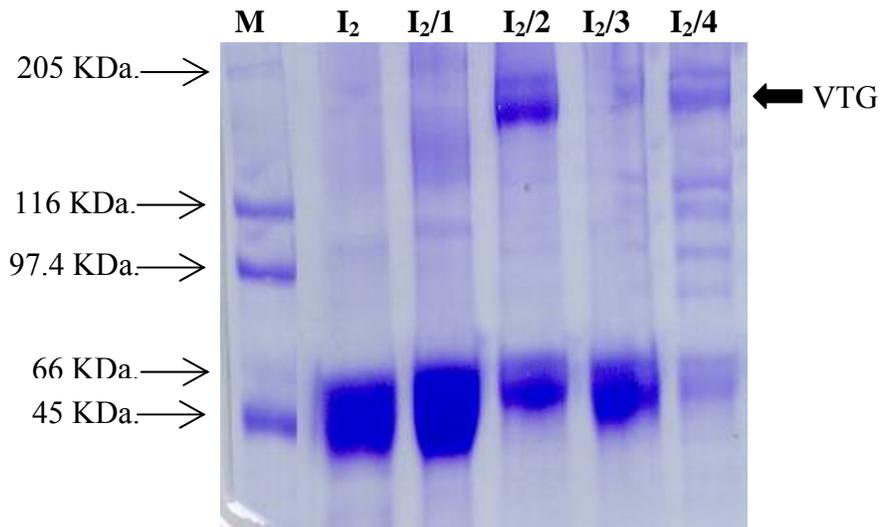


Figura 20.-. PAGE-SDS al 6% que muestra las diferentes concentraciones de VTG en el plasma, durante la inducción. M, marcador de peso molecular.

PURIFICACIÓN

Filtración en Gel

Para la cromatografía de exclusión se depositaron 0.5 ml de los 20 ml de plasma colectados, al final de la inducción, de uno de los ejemplares (I₂/4). El perfil de elusión de las proteínas de dicha muestra (Figura 7), mostró un pico predominante desde la fracción 35 hasta la 43. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante electroforesis en PAGE-SDS observándose bandas principales de alto peso molecular asociadas a otras (Figura 8). El peso molecular de una de las bandas coincidía con el de una banda que aparecía en el plasma de los machos después de la inducción. Las fracciones 37 a 41 se unieron para hacer un “pool” y con esta muestra llevar a cabo la precipitación de la VTG.

Después de la calibración de la columna de filtración en gel se calculó un peso molecular aparente, para las fracciones 37 a 41, de 585 KDa. de acuerdo a su coeficiente K_{av}.

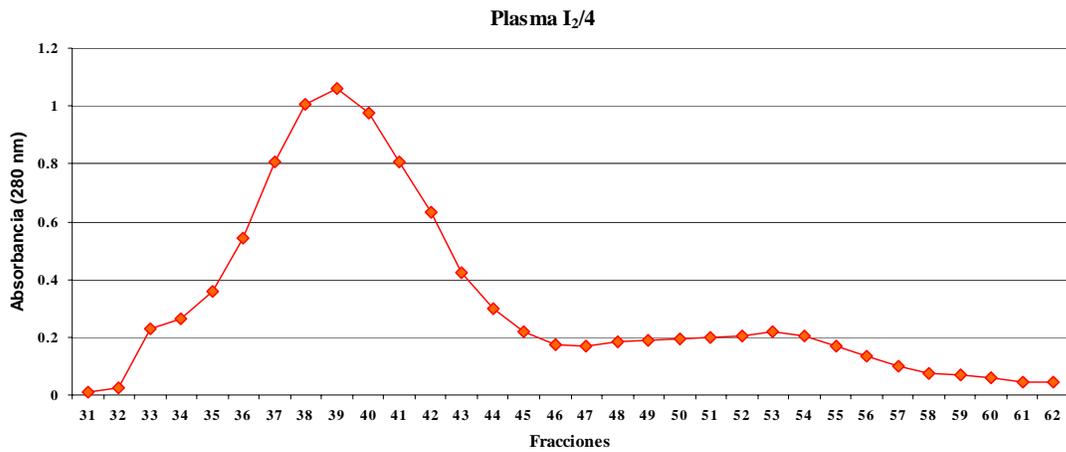


Figura 21. -Perfil de elución de la filtración en gel de las proteínas plasmáticas del macho inducido. 0.5 ml de plasma (I₂/4) se depositaron en una columna de Sephacryl-300. Se colectaron fracciones de 4 ml y la absorbancia se siguió a 280 nm.

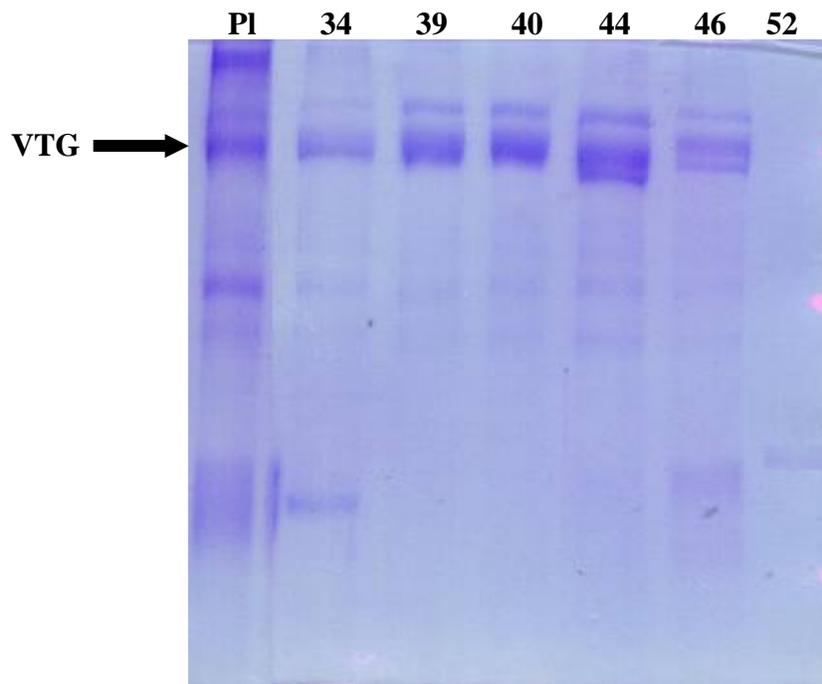


Figura 22. Análisis por electroforesis de las fracciones de la cromatografía de exclusión. PAGE-SDS al 6% teñido con azul de Coomassie. PI, plasma I₂/4; los números corresponden a las fracciones.

Precipitación

Al realizar la precipitación según el protocolo original descrito por Wiley *et al.* (1979), la mayor parte de la VTG se quedaba en el sobrenadante, por lo que se realizaron ensayos

modificando la dilución de la muestra. Al agregar tres volúmenes de agua bidestilada (bH₂O) a la muestra antes de la precipitación, la mayor parte de la VTG se quedó en el precipitado (Figura 9A), lo que contrasta con el método original. Sin embargo, como se puede observar, en el sobrenadante todavía quedaba VTG. Al agregar seis volúmenes más de bH₂O al sobrenadante se obtuvo otra vez una pastilla (Figura 9B) y se comprobó que la cantidad de VTG que quedaba en el sobrenadante era mínima, por lo que se optó por este último procedimiento para precipitar la VTG del “pool”. Los diferentes pasos de purificación de la proteína obtenida se recapitulan en la figura 10A. La proteína resultante de la precipitación fue reconocida por el anticuerpo de *A. tropicus* (Figura 10B), y ésta fue la que se utilizó para la inmunización.

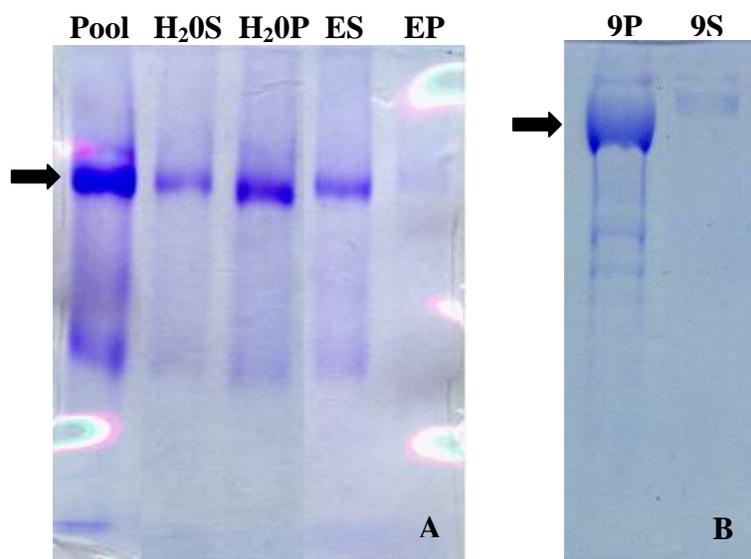


Figura 23. Comparación de los resultados de la precipitación selectiva de la VTG mediante electroforesis en PAGE-SDS al 6%. A, de acuerdo al método original, únicamente con EDTA y Mg²⁺ (ES, sobrenadante y EP, precipitado) y agregando 3 volúmenes de bH₂O (H₂OS, sobrenadante y H₂OP, precipitado). B, resultado de la precipitación después de agregar 6 volúmenes más de bH₂O al sobrenadante (9P, precipitado y 9S, sobrenadante). Las flechas señalan la banda de VTG. Tinción con azul de Coomassie.

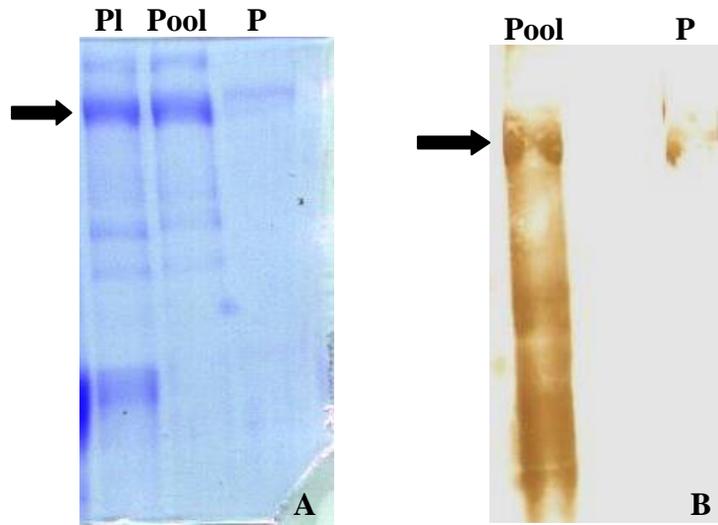


Figura 24. Análisis de las proteínas durante el proceso de purificación de la VTG. A, PAGE-SDS al 6%. Pl, plasma inducido; Pool, fracciones de la cromatografía de exclusión; P, precipitado de la VTG. B, *Western Blot* usando anticuerpo de *A. tropicus*, Pool, fracciones de la cromatografía de exclusión; P, precipitado de la VTG. Las flechas indican la banda de VTG.

Electroelusión

Con la electroelusión se obtuvo una banda única de VTG purificada (Figura 11A), que fue reconocida más adelante por el anticuerpo anti-VTG en *Western Blot* (Figura 11B). Pero la VTG se obtuvo en pequeñas cantidades y al parecer en una forma insoluble, por lo que no se pudo cuantificar con el Bradford, ni mostró reacción con el mismo anticuerpo en una inmunodifusión doble. Tampoco se obtuvo señal al analizarla con el ELISA.

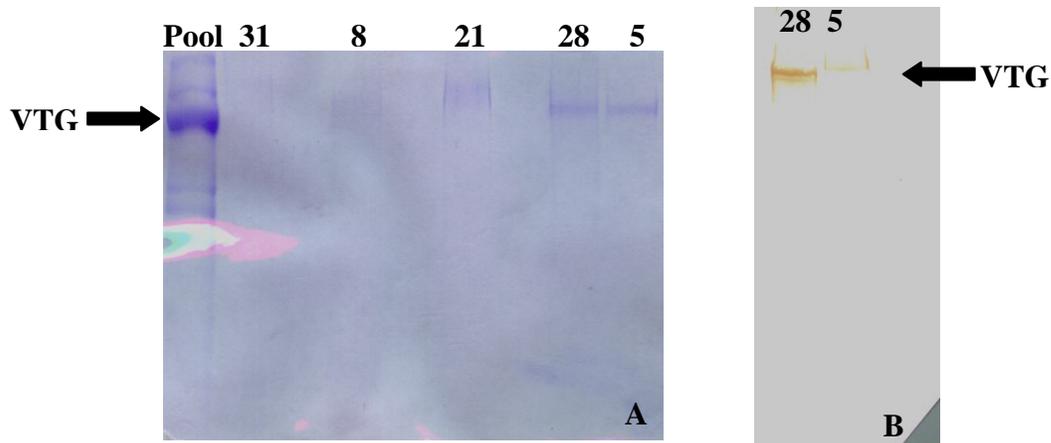


Figura 25. A, PAGE-SDS al 6%. Pool, fracciones del cromatógrafo. 31, 8, 21, 28, 5, VTG electroeluida en diferentes ocasiones. B, *Western Blot* con dos proteínas electroeluidas.

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS

Seguimiento de los Anticuerpos

La Tabla 9 resume los resultados de la inmunodifusión, donde se dio seguimiento a la presencia y aumento del título de los anticuerpos en el suero de conejo. Como puede observarse, el título de los anticuerpos incrementó con las sucesivas inyecciones del antígeno (VTG) hasta llegar a 1:8, éste fue el título alcanzado por los anticuerpos en la última muestra de sangre, como se observa en la Figura 13. De esta última muestra, se obtuvieron 15 ml de suero que se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína A para separar las inmunoglobulinas.

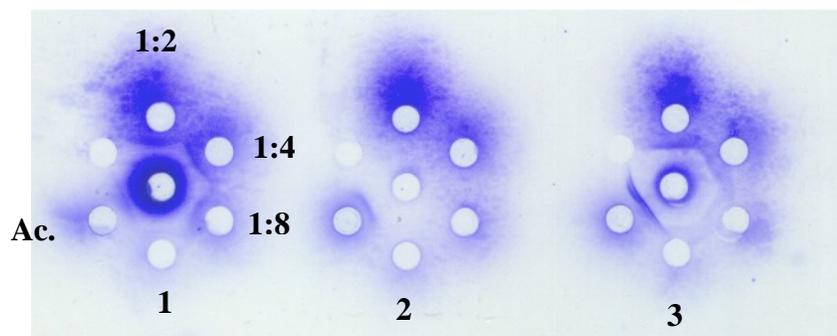


Figura 26.- Inmunodifusión doble de las diluciones del suero de conejo (1:2, 1:4 y 1:8) con anticuerpos anti-VTG. las diluciones del suero; Ac, anticuerpo anti-VTG de *A. tropicus*. Las tres rosetas tienen el mismo orden. 1, plasma inducido; 2, proteína electroeluida y 3, pool.

Purificación con Proteína A

La Figura 14 muestra los perfiles de elución de la cromatografía con proteína A, obtenidos del suero de conejo, con tres buffers a diferente pH.

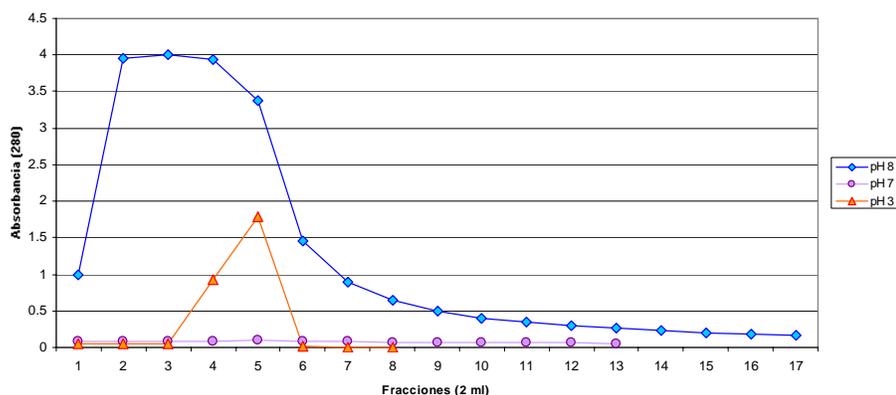


Figura 27. Perfil de elución de los anticuerpos por cromatografía de afinidad (proteína A-Sepharosa), obtenidos con buffer pH 8, pH 7 y pH 3.

Con el buffer de acetatos pH 3, se eluyeron dos fracciones proteicas (Figura 14). Estas y las correspondientes a los picos de mayor absorbancia eluidos con los buffers pH 8 y pH 7, se analizaron mediante inmunodifusión para comprobar si contenían anticuerpos. Como se muestra en la figura 15, únicamente las dos fracciones eluidas a pH ácido cruzaron con el pool de VTG, por lo tanto se unieron y se conservaron como anticuerpos (anti-VTG) purificados. Mediante *Western Blot* (Figura 16) se comprobó que estos anticuerpos anti-VTG purificados reconocían la banda correspondiente a la VTG en el plasma y en el pool, contrariamente, no reconocía banda alguna en el control negativo (plasma de macho).

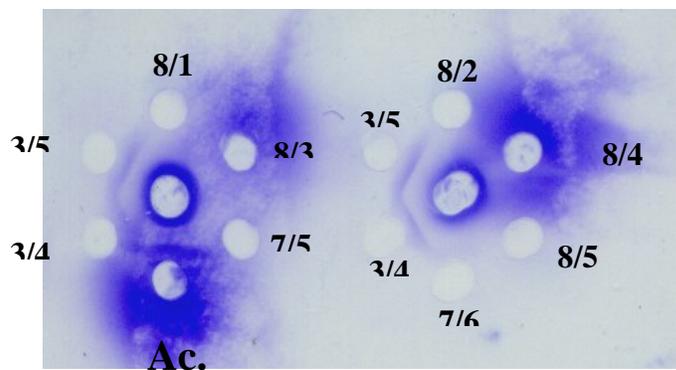


Figura 28. Inmunodifusión doble de las fracciones obtenidas de la purificación con proteína A. Ac., suero de conejo con anticuerpo anti-VTG; 8/1, 2, 3, 4 y 5, fracciones obtenidas con el buffer pH8; 7/5 y 6, fracciones obtenidas con el buffer pH7; 3/4 y 5 fracciones obtenidas con el buffer pH3. En el centro de las rosetas está el pool.

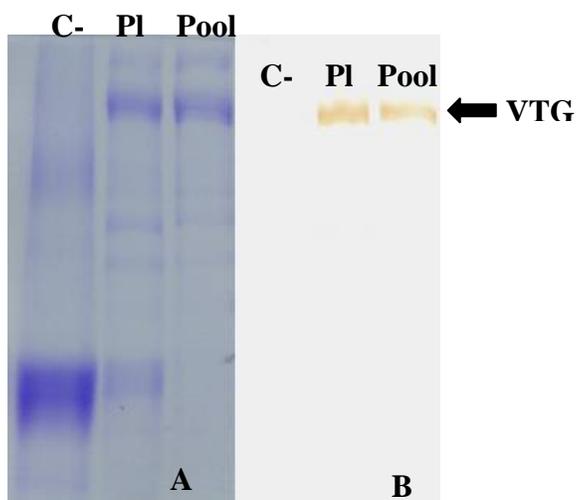


Figura 29.- PAGE-SDS al 6% (A), *Western Blot* (B). C-, plasma de macho; PI, plasma inducido; Pool, fracciones del cromatógrafo.

Especificidad de los Anticuerpos

Mediante *Western Blot* se compararon los anticuerpos purificados en este trabajo y los previamente preparados a partir de *A. tropicus* (Hernández, 2002). Se observó que el anticuerpo anti-VTG purificado tenía una buena especificidad, ya que en el *Western Blot* no reconoció ninguna banda del suero control (Figura 17A), a diferencia del anticuerpo de *A. tropicus* (Figura 17B). En otra prueba, realizada por inmunodifusión doble, se comprobó que el anticuerpo anti-VTG reconocía al estándar de de *A. tropicus*. Cabe notar que las

bandas de precipitación son sencillas en comparación con las que forma el anticuerpo de *A. tropicus*, que son dobles (Figura 18).

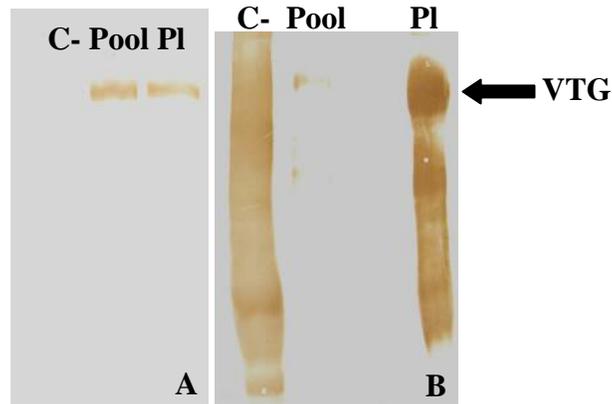


Figura 30. *Western Blot*. A, con anticuerpos anti-VTG y B, con anticuerpo de *A. tropicus*. C-, plasma de macho; Pool, fracciones del cromatógrafo; Pl, plasma inducido.



Figura 31. Inmunodifusión donde se emplearon los anticuerpos de *A. tropicus* y de *A. spatula* (anti-VTG), contra las mismas muestras. VTG, proteína de *A. tropicus*; Pool, proteína de *A. spatula*.

ELISA

Estandarización

En la primera prueba de la estandarización se comparó la fijación del antígeno a los pozos de la placa a tres pH diferentes. Aunque no hubo una gran diferencia entre las tres condiciones (Tabla 10), se escogió el buffer de carbonatos (pH 9.6) para unir la VTG a la placa, ya que la densidad óptica que se alcanzó al final del ensayo estaba entre 1 y 2 U y presentaba menor absorbancia del blanco.

Tabla XXXIII. Absorbancias obtenidas con 3 buffers de unión.

Buffer	Promedio del Blanco (3 repeticiones)	Promedio de Absorbancia-Blanco (3 repeticiones)
Acetatos	0.095	1.981
PBS	0.126	1.812
Carbonatos	0.089	1.943

En los ensayos para definir las cantidades de antígeno y primer y segundo anticuerpo, se obtuvo una densidad óptica entre 1 y 2, con 100 ng de VTG adheridos a la placa, 7.5 ng de anticuerpo anti-VTG por pozo y una dilución del segundo anticuerpo de 1:20,000 (Tabla 11).

Tabla XXIV. Valores obtenidos en una prueba de estandarización.

Anti-VTG (ng)	50 ng de VTG en la placa	100 ng de VTG en la placa	Anticuerpo secundario dilución 1:20,000
2.5	0.399	0.742	
5	0.776	1.321	
7.5	1.212	1.911	
10	1.614	2.393	

*Los valores son el promedio de la absorbancia de 2 repeticiones menos el promedio del blanco.

En base a los resultados de las pruebas de competencia, se decidió por las condiciones finales del ELISA (Tabla 12), con las cuales se obtuvo una buena linealidad (Figura 19), para empezar con la validación.

Tabla XXV. Condiciones finales del ELISA

Antígeno unido	100 ng de VTG en 200 µl de buffer de carbonatos.
Primer anticuerpo (anti-VTG purificado)	8.5 ng
Competidor	300 ng a 1.5 ng de VTG
Segundo anticuerpo	1:20,000
Sustrato de la peroxidasa	OPD

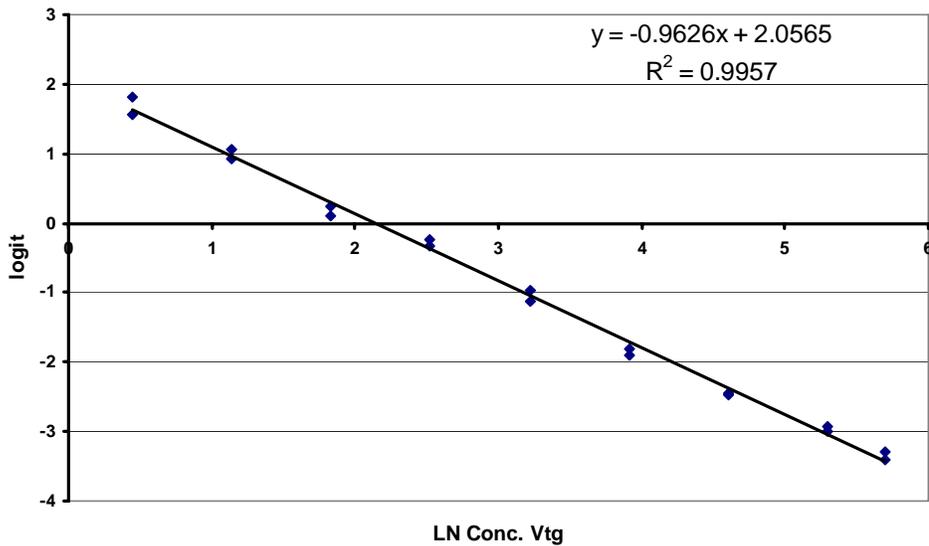


Figura 32. Regresión de la curva de 300 a 1.5 ng de VTG.

Validación

Las características del ELISA se presentan en la Tabla 13. De acuerdo al resultado del análisis de t-student para la sensibilidad del ensayo ($t = 2.82$, $P = 0.000$, $gl = 16$), se concluyó que las muestras: dilución 1.5 ng y B max eran significativamente diferentes. La especificidad del ELISA se demostró con el valor superior al cero de la curva de las dos muestras de pescado blanco analizadas y del los ejemplares control (catanes macho). Por último, se encontró que no había diferencias significativas entre las cuatro curvas comparadas ($F_{cal.} = 3.82 < F_{0.05} = 4.01$ con 3 g.l.).

Tabla XXXVI. Características del ELISA.

Rango de Linearidad	R^2 0.9942-0.9964 (n = 6)
Límite de detección	1.5 ng (da 87.9% de unión)
Coefficiente de Variación Inter-ensayo	22% (n = 57)
Coefficiente de Variación Intra-ensayo	18% (n = 46)
Recuperación	Con plasma de macho 87% Con plasma inducido 99%

Análisis de las Muestras

Los resultados de la cuantificación de proteínas y de la cantidad de VTG presente en las muestras se resumen en la Tabla 14. En el análisis de las muestras de plasma con el ELISA se encontró que durante la inducción hubo dos picos de producción de VTG en el plasma (Figura 20), el primero se encontró en la segunda semana después de la inducción y el segundo al final. En el caso del mucus se observó un aumento constante de la concentración de VTG a lo largo de la inducción.

Tabla XXXVII. Concentración de proteína total y VTG en las muestras durante la inducción.

Muestras	Ejemplar 1		Ejemplar 2	
	Proteína mg/ml	VTG mg/ml	Proteína mg/ml	VTG mg/ml
I	3.35	0	2.11	0
I/1	0.95	0.13	0.37	0.01
I/2	12.71	7.33	19.08	9.41
I/3	0.16	0.018	0.22	0.04
I/4	77.46	27.96	66.48	27.72
M/2			0.54	0.005
M/3	0.75	0.04	0.64	0.013
M/4	10.57	1.25	2.21	0.46

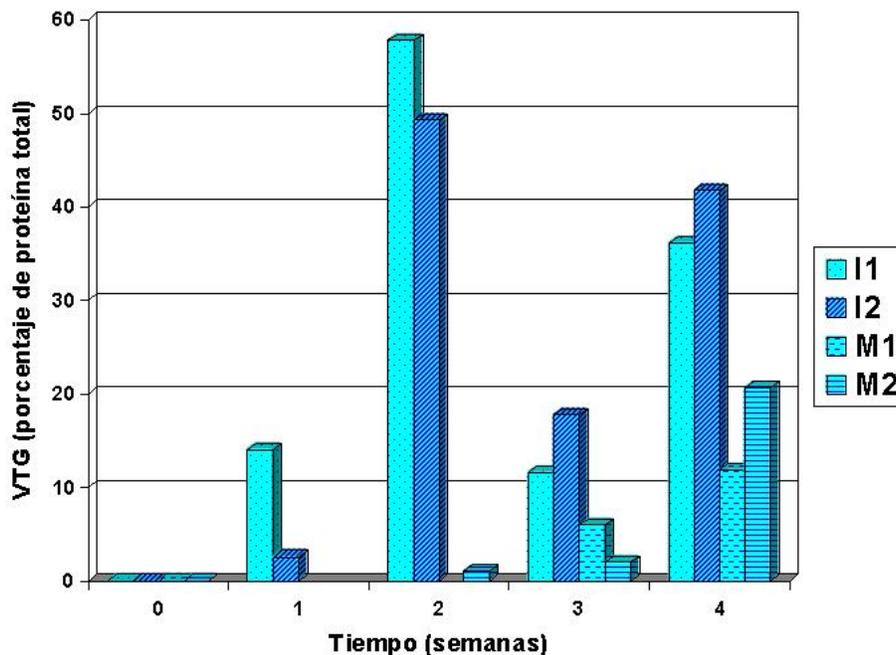


Figura 33. Concentración de VTG en plasma (I1 e I2) y en mucus (M1 y M2) de los ejemplares inducidos.

Los resultados del análisis de varianza, desarrollado para determinar las diferencias existentes entre las muestras de las 4 semanas de la inducción, revelaron que no había diferencias significativas entre las repeticiones (valores obtenidos en diferentes ensayos para la misma muestra), pero sí entre las semanas ($F = 0.7023$; g.l.= 10; $P < 0.05$ y $F = 0.0001$; g.l. = 3; $P < 0.05$, respectivamente para el ejemplar 1 y $F = 0.8997$; g.l.= 13; $P < 0.05$ y $F = 0.0003$; g.l. = 3; $P < 0.05$, respectivamente para el ejemplar 2).

Así mismo, la comparación de medias por el método de Duncan reveló que las semanas 1 y 3 son un grupo homogéneo (no existe diferencia significativa entre ellas), al igual que las semanas 2 y 4. Sin embargo, sí existen diferencias significativas entre ambos grupos. Los resultados fueron iguales para los dos ejemplares.

DISCUSIÓN

Obtención y purificación de VTG:

En el presente trabajo se optó obtener vitelogenina plasmática por medio de la inducción de machos con β -estradiol, siguiendo el protocolo usado anteriormente por Hernández (2002) en *A. tropicus*. La misma dosis (10 mg de β -estradiol/Kg de peso del pez a la semana) fue empleada por Norberg y Haux (1985) en *Salmo gairdneri* y en *Salmo trutta*, por Tyler y Sumpter (1990a) en *Cyprinus carpio* y por Schafhauser-Smith y Benfey (2002) en *Salvelinus fontinalis*, durante dos semanas, obteniendo después del tratamiento, proteína suficiente para su purificación. Por otro lado, en un trabajo con *Macrozoarces americanus* tratado con la misma dosis, Yao y Crim (1996) mostraron mediante electroforesis la aparición y el incremento de la concentración de VTG a lo largo de las tres semanas de tratamiento.

En el catán, a las dos semanas de inducción, aparece una banda de alto peso molecular en la electroforesis de las proteínas plasmáticas.

La purificación de la VTG, de diferentes especies de peces, se ha realizado combinando algunos métodos (Tabla XXIX). De acuerdo a la bibliografía, las combinaciones de métodos más utilizadas son, la precipitación selectiva y el intercambio de iones y la filtración en gel y el intercambio de iones. Sin embargo, la diferencia en los métodos y las combinaciones de los mismos, sugiere que la purificación depende no sólo de éstos, sino que también depende de la especie. Considerando las características de la VTG y la vitelina de los lepisosteidos, por ejemplo, su alto contenido de fosfatos, en este trabajo se optó por combinar la filtración en gel y la precipitación selectiva de la VTG.

Con la modificación a la precipitación se obtuvo la banda de VTG libre de las proteínas de bajo peso molecular, sin embargo, una banda de mayor peso molecular que co-eluyó con

la VTG en la cromatografía de exclusión, se encontraba aún en el precipitado, por esta razón se intentó un tercer paso de purificación: electroforesis y electroelución de la banda. Este procedimiento permitió obtener la banda de VTG pura y sin signos de degradación (Figura 25), pero las cantidades obtenidas eran mínimas y la proteína tenía tendencia a precipitar, por lo que no se pudo utilizar en el ELISA. Por esta razón, se prefirió utilizar la proteína precipitada para inmunizar al conejo.

La presencia de dos bandas después del proceso de purificación, también fue reportada por Hernández (2002) quien, después de purificar con precipitación e intercambio de iones, encontró que la banda de VTG todavía estaba asociada a otra banda de un peso molecular similar. En el caso del catán se presentó un resultado similar al trabajar con la lipovitelina, donde Cortes (2003) encontró dos bandas, una de 167.57 KDa. y otra de 149.28 KDa., después de la purificación mediante precipitación, filtración en gel e intercambio de iones.

PURIFICACIÓN Y ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS

El protocolo de inmunización permitió obtener suero con un buen título de anticuerpos anti-VTG, lo que sugiere que la VTG es inmunogénica. Este resultado se puede explicar por su alto peso molecular y por el hecho de no presentar una contra-parte homóloga en el conejo. La purificación de los anticuerpos se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con proteína A. Con este procedimiento se lograron aislar las IgG del suero hiperinmune, y se eliminaron otros componentes del mismo (Figura 27). Los anticuerpos anti-VTG eluyeron de la columna con el buffer a pH ácido, como se demuestra en la Figura 15, ya que de las fracciones obtenidas, sólo éstas reaccionaron con el pool. Adicionalmente, dichas fracciones reconocieron la banda de VTG en el plasma y en el pool (Figura 29), por lo que éstas se guardaron como anticuerpos anti-VTG purificados.

La especificidad de los anticuerpos se demostró al reconocer la banda de VTG en el pool y el plasma y no producir reacción con el plasma de macho (Figura 29). Así mismo, mediante una inmunodifusión doble, los anticuerpos anti-VTG reconocieron el estándar de VTG de *A. tropicus* (Figura 31), lo que se explica al ser esta última una especie estrechamente relacionada con el catán. Además, la calidad de los anticuerpos desarrollados se comprobó al obtener una sola banda de precipitación en todas las pruebas de inmunodifusión doble (Figuras, 26, 28 y 29), y al no ver señal inespecífica con las proteínas plasmáticas de los machos, lo cual contrasta con los anticuerpos desarrollados para la VTG de *A. tropicus*, los cuales formaban dos bandas de precipitación (Figuras, 19 y 29) y eventualmente presentaban reacciones cruzadas con los machos (Hernández, 2002).

ELISA

Varios autores han realizado inmunoensayos tipo ELISA para cuantificar la VTG en diferentes especies de peces (Tabla XXIX). De acuerdo a la bibliografía, el ensayo más usado es el competitivo y se utilizan, en general, anticuerpos policlonales, ya sea contra la VTG o la lipovitelina de la misma especie o de otras relacionadas. El ELISA desarrollado en el presente trabajo fue también competitivo, utilizando anticuerpos policlonales contra la VTG de *A. spatula* y un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. En la estandarización del ensayo se buscaron las concentraciones de los reactivos con las que se obtuvieran entre 1 y 2 U de densidad óptica. Así, finalmente, la competencia por el anticuerpo (8.5 ng/100 µl) se realizó entre la VTG unida a la placa (100 ng por pozo) y la contenida en la curva estándar (1.5 – 300 ng/100 µl) y en las muestras de plasma o mucus (diluidas 1:100, 500, 1,000, 5,000, 10,000 o 20,000).

La especificidad del ensayo fue demostrada, como lo reportaron otros autores, por la falta de reacción del anticuerpo con el plasma de machos, lo que quiere decir que los anticuerpos no reaccionan con otra proteína que no sea la VTG. También se demostró por que los anticuerpos reconocen a la proteína encontrada en el plasma y en el mucus al igual que a la proteína purificada (Nuñez *et al.*, 1989; Cuisset *et al.*, 1991; Kishida *et al.*, 1992; Mendoza *et al.*, 1993; Bon *et al.*, 1997; Susca *et al.*, 2001). Esto confirma los resultados obtenidos con las pruebas de *Western Blot* (Figura 30). Además, en el ELISA, se demostró que tampoco hubo reacción con proteína alguna de las muestras de una especie (*Chirostoma estor*) no relacionada con el catán. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el anticuerpo que obtuvimos reconoce la proteína en *A. tropicus*, por lo que cabe esperar que este ensayo pueda detectar niveles de VTG en el pejelagarto y posiblemente en otros lepisosteidos.

La sensibilidad del ensayo, concentración de VTG que dio un 87.9% (n = 6) de unión, fue de 1.5 ng/pozo (15 ng/ml). Este valor es igual al que reportaron Cuisset *et al.* (1991), además también es similar a otros valores reportados (Nuñez *et al.*, 1989; Kishida *et al.*, 1992; Bon *et al.*, 1997; Heppell y Sullivan, 1999; Susca *et al.*, 2001; Schafhauser-Smith y Benfey, 2002). Aunque otros autores han reportado una sensibilidad mayor, como Mendoza *et al.* (1993) con una sensibilidad de 2.3 ng/ml y Mañanós *et al.* (1994b) con 1 ng/ml. Sin embargo, algunos de los autores han encontrado que la sensibilidad en sus ensayos es suficiente para medir las concentraciones de VTG de acuerdo a los niveles que encontraron para la especie. Así, Cuisset *et al.* (1991), reportaron que los niveles mínimos de VTG encontrados en hembras al inicio de la vitelogénesis fueron de 160 µg/ml en *Acipenser baeri*. Nuñez *et al.* (1989), en un trabajo con *Solea vulgaris*, consideraron suficiente la sensibilidad alcanzada, ya que la concentración mínima de VTG que encontraron para esta

especie fue de 100 µg/ml en hembras en el periodo de reposo. Bon *et al.* (1997) en un ensayo para la VTG de *Oncorhynchus mykiss*, encontraron que el nivel de VTG en hembras inmaduras era de 65 µg/ml y en hembras juveniles un año o más antes de su primera ovulación es de 1µg/ml. Para el catán no hay cantidades reportadas de los niveles de VTG en las hembras. Sin embargo, Hernández (2002) reportó para *A. tropicus* una concentración menor de 1.3 mg/ml de VTG en machos, de 1.4 a 2.9 mg/ml para hembras en el proceso de vitelogénesis y mayor de 3 mg/ml para hembras maduras. En nuestro ensayo la sensibilidad alcanzada permitiría detectar un porcentaje de $0.2 \cdot 10^{-4}$ % de VTG en comparación a las proteínas totales. Por lo cual la prueba desarrollada se considera suficientemente sensible.

La variación inter-ensayo (22%) que se obtuvo fue alta comparada con la obtenida por otros autores (Nuñez *et al.*, 1989; Cuisset *et al.*, 1991; Kishida *et al.*, 1992; Mendoza *et al.*, 1993; Bon *et al.*, 1997), sin embargo es similar a la obtenida por Hennies *et al.* (2003) que, en un ensayo con *Cyprinus carpio*, alcanzó 24%, en éste los autores explican que la elevada variación se debió a la degradación de la VTG. En nuestro caso cabría esperar que la variación se deba a la misma causa, ya que se usaron las mismas muestras en los diferentes ensayos, por lo que fueron sometidas a varios ciclos de congelación y descongelación. Además, en base al resultado obtenido del análisis de 4 curvas estándar, donde se encontró que no había diferencias significativas entre ellas, se puede decir que la reproducibilidad del ensayo es buena. La variabilidad intra-ensayo fue de 18%, valor similar al obtenido por algunos autores (Cuisset *et al.*, 1991; Kishida *et al.*, 1992). La recuperación fue de alrededor de 100% cuando se ensayó con plasma de un ejemplar inducido, sin embargo al mezclar la VTG con el plasma del control, se encontró que la recuperación bajaba a 87%. Lo que se podría explicar por la interacción de la VTG con proteínas plasmáticas que podrían secuestrar a la proteína y evitar que se una los anticuerpos.

CAPITULO 4

CULTIVO LARVARIO Y CRECIMIENTO DE JUVENILES CON DIETAS ARTIFICIALES

Introduccion

El entendimiento de la fisiología digestiva puede ayudar a comprender la ecología de las especies, al desarrollo de dietas mas eficientes y al establecimiento de nuevos esquemas de alimentación (Buddington, 1985). Los cambios que se presentan durante la ontogénesis digestiva sugieren también cambios en los requerimientos de nutrientes involucrados en la formación y desarrollo de diferentes órganos, sistemas y sus funciones (Dabrowski, 1986). Las larvas de peces se caracterizan por una organogénesis incompleta, lo que resulta en un funcionamiento digestivo diferente al de los juveniles y los adultos, como consecuencia se requieren dietas especiales para larvas, sin embargo la mayoría de estas tienen dificultad para utilizar dietas artificiales (Verreth *et al.*, 1992). Una gran parte de las investigaciones actuales están enfocadas a desarrollar dietas artificiales para larvas de peces (Moyano *et al.*, 1996). Para preparar una dieta adecuada se debe considerar la variación entre las especies así como otras características de la dieta (tamaño, densidad, atracción y estabilidad en el agua de las partículas) por lo cual se requiere realizar diferentes experimentos para determinar las características de la dieta y se debe determinar la digestibilidad de los ingredientes preferentemente utilizando las enzimas endógenas (Glass *et al.*, 1989).

La utilización de dietas preparadas permite tener flexibilidad en la composición de las mismas (Bromley, 1978). Por otra parte el uso prolongado de alimento natural resulta impráctico y costoso (Duray y Bagariano, 1984). De esta manera, en algunas especies reproducidas en cautiverio más del 90% de las larvas producidas son liberadas inmediatamente después de la eclosión, siendo limitado el cultivo por la necesidad de

suministrar alimento vivo a las larvas (Rosch y Appelbaum, 1985), siendo este el caso del catán, cuya propagación artificial resulta indispensable para mantener la pesquería.

ANTECEDENTES

Se ha demostrado que es posible mantener larvas de peces marinos y de agua dulce empleando dietas artificiales (Duray y Bagariano, 1984). En general han sido utilizadas principalmente tres estrategias diferentes para acondicionar larvas al consumo de dietas artificiales con la finalidad de eliminar o reducir la utilización de alimento vivo. Siendo el acondicionamiento denominado directo desde el primer alimento, el acondicionamiento indirecto después de un periodo con alimento vivo hasta la metamorfosis o bien el acondicionamiento progresivo al incorporar cantidades graduadas de alimento vivo y artificial (Person-Le Rauyet, 1989). El acondicionamiento directo generalmente se realiza en larvas de talla grande y ha sido utilizado en carpas (Dabrowski *et al.*, 1978), en larvas de salmónidos y esturiones (Dabrowski *et al.*, 1985), en larvas de *Solea solea*, aunque el crecimiento ha resultado menor que con alimento vivo (Appelbaum, 1985), en larvas de *Coregonus clupeaformis*, aunque en este caso se presentaron problemas de escoliosis, lordosis y comportamiento de nado errático (Zitzow y Millard, 1988) y en larvas de *Sparus aurata* en las que se observó una reducción del crecimiento y sobrevivencia (Tandler y Kolkovski, 1991). Los problemas encontrados al utilizar esta estrategia de acondicionamiento han sido atribuidos a una baja calidad de huevos y larvas (Dabrowski *et al.*, 1985), a deficiencias nutricionales de la dieta (Zitzow y Millard, 1988), una baja afinidad de las enzimas proteolíticas hacia los sustratos artificiales ofrecidos en las dietas formuladas (Dabrowski y Culver, 1991; Tandler y Kolkovski, 1991; Kolkovski *et al.*, 1993) y a una baja tasa de ingestión de las partículas (Kolkovski *et al.*, 1993).

El acondicionamiento indirecto después de un periodo de alimento natural ha sido utilizado en larvas de turbot (*Scophthalmus maximus*), encontrándose que el uso de alimento vivo en cantidades limitadas es importante durante el acondicionamiento de larvas pequeñas, pero no resulta importante en larvas grandes (Bromley, 1978). En Chanos chanos se intentó acondicionar las larvas con un cambio abrupto de alimento natural a alimento artificial, con resultados mediocres obteniéndose mejores resultados cuando el acondicionamiento fué gradual (Duray y Bagariano, 1984). Por otra parte se ha observado que en Solea solea un periodo prolongado con alimento vivo pospone y dificulta el acondicionamiento, mientras que un periodo corto disminuye el crecimiento (Appelbaum, 1985).

En contraste con lo anterior, se ha observado que el acondicionamiento de larvas pequeñas es difícil si se realiza directamente con dietas artificiales, mientras que se pueden obtener buenos resultados si se combina con alimento vivo (Person-Le Ruyet, 1989). Con esta estrategia se ha logrado definir una secuencia graduada de alimento vivo y artificial en *Lates calcarifer*, permitiendo reducir o eliminar el canibalismo observado en el momento en que las presas vivas son reemplazadas por alimento artificial (Fuchs y Nedelec, 1989). Igualmente una estrategia de acondicionamiento gradual ha sido utilizada para larvas de *Dicentrarchus labrax* (Devresse *et al.*, 1991).

METODOLOGÍA

Condiciones experimentales

La reproducción en cautiverio de catán fue realizada en el Centro Acuícola Tancol, en Tamaulipas, de acuerdo la metodología anteriormente descrita (Aguilera *et al.*, 2002).

Larvas de 1 DDE fueron transportadas en bolsas de plástico con oxígeno al laboratorio del Grupo Ecofisiología en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las larvas fueron aclimatas en tanques de 1700 L hasta el 4 DDE. En este momento 6000 larvas fueron distribuidas al azar en 12 tanques de fibra de vidrio de 500 L (230 x 70 x 30 cm). Los tanques fueron conectados a un sistema de recirculación mediante un biofiltro de 500 L. El flujo de agua fue impulsado mediante una bomba de 1/8 hp, igualando el recambio de las canaletas mediante válvulas. En días alternos se reemplazó un 30% del volumen del sistema para mantener la calidad del agua. La temperatura del agua fue mantenida a 28 °C y el oxígeno disuelto por encima de 6 ppm.

Dietas

Dos tipos de dietas comerciales de iniciación fueron comparados contra dos controles: 1) Micropartículas semiflotantes producidas mediante migajas de extrusión (EC), obtenidas de Pedregal Silver Cup, S.A., fueron utilizadas las partículas en presentación de Iniciación, Alevín I y Alevín II con tamaños de 0.3, 0.6 y 1.18 mm respectivamente. El análisis de garantía de estas dietas indica un contenido mínimo de 52% de proteína y 14% de lípidos. 2) Microesferas semiflotantes producidas mediante extrusión/maomerización (EM), obtenidas de Purina, S.A., fueron utilizadas las partículas en presentación de peces Maternidad con tres tamaños 0.5, 0.75 y 1.2 mm. El análisis de garantía indica un contenido mínimo de 45% de proteína y 11% de lípidos. 3) Control con Alimento vivo consistente en nauplios de *Artemia salina* recién eclosionados (LF), de la variedad San Francisco Bay. 4) Un control fue mantenido en inanición, sin alimento exógeno (S).

Flotabilidad de las dietas

La tasa de sedimentación de las dietas EC y EM fue evaluada mediante la cuantificación de sólidos suspendidos sobre un periodo de tiempo (Backhurst y Harper, 1988; Baskerville-

Bridges y Kling, 2000). Las dietas fueron previamente deshidratadas en una estufa a 80°C durante 12 horas. Se utilizo un recipiente redondo de 30 cm de diámetro y 10 cm alto, conteniendo 5 litros de agua dulce a 28°C y provisto de aireación mediante un air-lift para simular la turbulencia presente en las canaletas de cultivo. Se colocaron 2.5g para cada dieta y después de 5 minutos fue suspendida la aireación para recuperar el alimento flotante en un papel filtro previamente secado y pesado. El papel filtro con las partículas fue deshidratado a 80°C durante 12 h para posteriormente determinar el peso del alimento recuperadas por diferencia. La flotabilidad fue expresada en porcentaje de alimento recuperado.

Diseño experimental

Para cada tratamiento (EC, EM, LF, S) se utilizaron 3 canaletas con 500 larvas c/u. El suministro del alimento inicio al 5 DDE. Para las dietas EC y EN del 0 al 4 DF se utilizaron la partícula mas pequeña (0.3 y 0.5 mm respectivamente), las cuales fueron sustituidas del 10 al 14 DDE por las de tamaño intermedias (0.6 y 0.75 mm respectivamente) y éstas a su vez del 15 al 19 DDE por las partículas mas grandes (1.18 y 1.25 mm respectivamente). En LF, los nauplios de Artemia fueron proporcionados del 5 al 19 DDE, mientras que en S las larvas fueron mantenidas en inanición durante el periodo experimental. Las dietas fueron suministradas *ad libitum* en 4 raciones diarias. A 5, 10 y 14 DDE se tomó una muestra de seis larvas por canaleta, mientras que al final del bioensayo, 20 larvas por canaleta fueron muestreadas. Las larvas fueron tomadas antes de la primera alimentación y posteriormente fueron anestesiadas con MS222. Para cada larva se registro la longitud total y la longitud del hocico utilizando un vernier con 0.1 mm de exactitud y después de retirar el exceso de agua con papel filtro se registró el peso fresco en una balanza analítica con 0.1 mg de exactitud. Posteriormente la larva fue disectada en una placa a 4 °C para separar la cabeza

(a la altura del opérculo branquial), el tracto digestivo y el cuerpo o carcas. Los tractos digestivos de cada tratamiento fueron liofilizados en lote, mientras que el carcas fue individualmente liofilizado para registrar el peso seco por larva.

Inicio del cultivo larvario

Para determinar el inicio del acondicionamiento al cultivo se utilizaron larvas de catán obtenidas del Centro Acuícola Tancol, las cuales fueron transportadas al Laboratorio Húmedo del Grupo Ecofisiología FCB/UANL. El diseño consistió en utilizar larvas con dos grados de desarrollo para iniciar el cultivo: a) larvas con vitelo de 2 días después de la eclosión (DDE) y b) larvas sin vitelo de 7 DDE. Las larvas de estas edades fueron colocadas en tanques de cultivo circulares de 500 L (1.70 X 70), utilizando 3 tanques por tratamiento. La densidad de larvas inicial fue de 500 por tanque (1 larva/L). La alimentación consistió de una microdieta de 500 micras suministrada ad libitum en 4 raciones diarias (8:00; 12:00; 16:00; 20:00 hrs.). Para evaluar el desarrollo del cultivo cada 7 días se registro la sobrevivencia y se tomo una muestra de 20 larvas por tanque para registrar el peso en (g) y la talla (cm) de cada larva. El bioensayo fue conducido durante 4 semanas.

Determinación del sistema de cultivo

Con la finalidad de determinar las características de los tanques de cultivo mas apropiados para el cultivo de crías de catán se realizo un bioensayo en el cual se probaron dos tipos de tanques de cultivo. Se obtuvieron larvas de catán recién eclosionadas en el Centro Acuícola Tancol. Las larvas fueron transportadas en bolsas de plástico con oxígeno a las instalaciones del Grupo Ecofisiología en la Fac. de Ciencias Biológicas U.A.N.L., en donde fueron colocadas en canaletas de fibra de vidrio para ser aclimatadas. Las larvas fueron distribuidas en dos dispositivos de cultivo diferente: a) canaletas de fibra de vidrio

de 230 cm de largo, 70 cm de ancho y 30 cm de altura, con un volumen de agua de 500 l; b) tanques circulares de polietileno PVC de 170 cm de diámetro y 70 cm de altura con un volumen de agua de 1500 l. La densidad inicial fue de 1 larva/ litro. Los sistemas fueron conectados a un dispositivo de filtración y recirculación del agua para mantener su calidad. La temperatura del agua fue de 27 °C y se suministró oxígeno constante mediante un compresor. A partir del quinto DDE se suministró el alimento dividido en cuatro raciones para que las larvas se alimentaran ad libitum.

Crecimiento de juveniles

Se utilizaron juveniles de *Atractosteus spatula* de un mes de edad mantenidos en dos estanques de 2X2X2 m, con 86 y 100 organismos respectivamente, en condiciones de pH 10 a 25 °C + 5 °C. Estos ubicados en el exterior, a un recambio de agua de 0.3 lts/min.

Se realizó una medición de longitud y peso inicial para determinar la biomasa por estanque a fin de suministrar el 5% en alimento diariamente dividido en dos o tres raciones. El alimento comercial utilizado está diseñado para trucha y contiene un 50% de proteína. El desarrollo del experimento tiene una duración de tres semanas donde se tomaron mediciones de peso y longitud a 20 organismos por estanque elegidos al azar al término de cada semana. Las fórmulas fueron aplicadas a promedios de datos recabados de las muestras. Los datos fueron almacenados en una bitácora para su análisis y para la obtención de las siguientes variables (Hepher, 1976): Factor de condición; Tasa de crecimiento específico; Razón de conversión alimenticia; Razón de eficiencia proteica

RESULTADOS

Flotabilidad de las dietas

Las dietas EC presentaron una flotabilidad de 64.8, 66.4 y 65.6% para las partículas de 0.3, 0.6 y 1.18 mm respectivamente. Mientras que las dietas EM presentaron una flotabilidad de 43.4, 49.0 y 46.7% para las partículas de 0.5, 0.75 y 1.25 mm respectivamente.

Sobrevivencia

A 10 DDE la sobrevivencia se mantuvo alta para todos los tratamientos, siendo la menor de 90 % para las larvas en inanición (S). A los 14 DDE la sobrevivencia continuó por encima del 90% para EC, EM y LF, sin diferencias significativas entre éstos tratamientos. Sin embargo, en S se presentó una fuerte mortalidad debido a la inanición, sin presentar sobrevivencia después de 14 DDE. De 14 a 20 DDE en los tratamientos EC, EM y LF se observó mortalidad por canibalismo, produciéndose generalmente la muerte tanto de la presa como del depredador debido a la imposibilidad para ingerir todo el cuerpo de la presa. De esta forma, la sobrevivencia a 20 DDE fue cercana al 60% para los tres tratamientos sin diferencias significativas entre estos (Figura 1).

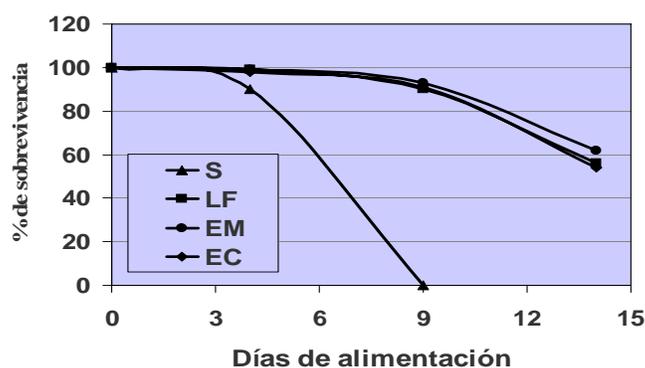


Fig. 34. Sobrevivencia (%) de larvas con diferentes dietas

Variabes morfométricas

Las variables TL, SL, WW, DW y SGR presentaron el mismo comportamiento para

cada muestreo (Tabla 1). A 10 DDE se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, alcanzando un mejor desempeño las larvas en EM y LF (sin diferencias significativas), seguidas de las larvas en EC y finalmente las larvas en S. A 14 DDE las diferencias fueron mas marcada, siendo éstas significativas entre todos los tratamientos. En este caso EM continuó con los valores más altos. Sin embargo, en este momento el desempeño de las larvas EC fue superior a las larvas LF, mientras que las larvas S continuaron con el menor desempeño. A 20 DDE, no existiendo sobrevivencia en C, se presentaron diferencias significativas entre los tres tratamientos restantes, siendo de mayor a menor EM, EC y LF. Este comportamiento es mas claramente observado en el peso fresco (Figura 2).

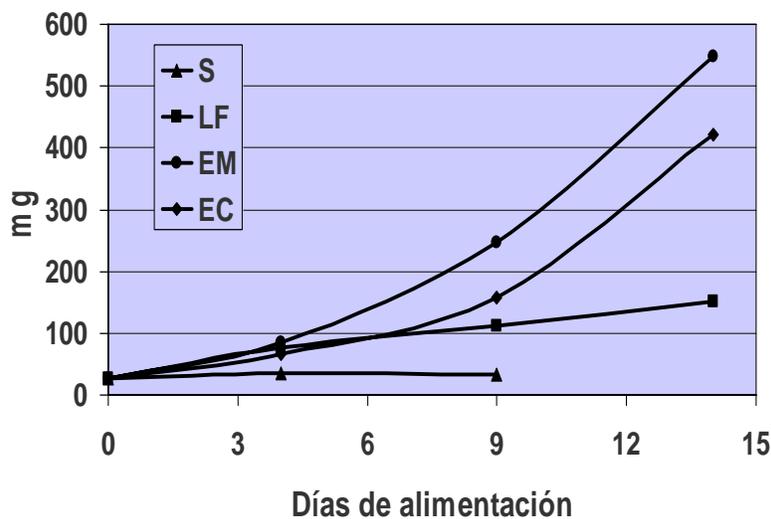


Fig. 35. Crecimiento en peso (mg) de larvas alimentadas con diferentes dietas.

Tabla XXXVII. Variables morfométricas de larvas de catan alimentadas con diferentes dietas

DDE	Variable	Migajas de extrusión (EC)	Microesferas extruidas (EM)	Alimento Vivo (LF)	Control (S)
4	Longitud total (mm)		15.42 ± 0.86		
	Longitud hocico (mm)		1.14 ± 0.12		
	Peso fresco (mg)		29.12 ± 2.20		
	Peso seco (mg)		1.18 ± 0.25		
10	Longitud total (mm)	22.39 ± 1.4 b	23.54 ± 2 a	23.66 ± 0.746 a	18.9 ± 1.5 c
	Longitud hocico (mm)	2.21 ± 0.13 b	3.34 ± 0.37 a	3.35 ± 0.37 a	1.39 ± 0.15 c
	Peso fresco (mg)	67.13 ± 19 b	84.99 ± 21.5 a	77.28 ± 7.63 a	35.95 ± 3.5 c
	Peso seco (mg)	3.49 ± 0.77 b	4.31 ± 1.26 a	4.275 ± 0.75 a	2.06 ± 0.81 c
	SGR (%)	26.26 ± 0.25 b	31.23 ± 7.50 a	31.6 ± 4.9 a	12.6 ± 7.04 c
14	Longitud total (mm)	49.8 ± 22 b	68.5 ± 9.7 a	32.9 ± 11.7 c	14.8 ± 5.3 d
	Longitud hocico (mm)	542 ± 224 ab	896 ± 224 a	408 ± 155 b	70.4 ± 24 c
	Peso fresco (mg)	12.23 ± 5.3 a	13.14 ± 3 a	13.3 ± 6.1 a	5.2 ± 2 b
	Peso seco (mg)	4.94 ± 1.8 b	4.93 ± 1.13 b	4.6 ± 1.7 b	9.7 ± 3 a
	SGR (%)	2.7 ± 1.1 b	4.05 ± 1.4 a	2.32 ± 0.5 b	0.13 ± 0.07 c
20	Longitud total (mm)	42.10 ± 5.33 b	46.14 ± 6.3 a	30.50 ± 3 c	
	Longitud hocico (mm)	6.44 ± 0.16 b	7.05 ± 0.18 a	4.33 ± 0.48 c	
	Peso fresco (mg)	420.6 ± 178 b	547.8 ± 229 a	127.51 ± 51 c	
	Peso seco (mg)	32.85 ± 12.21 b	46.23 ± 24.5 a	7.29 ± 3.5 c	
	SGR (%)	19.07 ± 7.06 a	18.84 ± 10 a	-1.02 ± 7 b	

Inicio del cultivo larvario

Los resultados muestran claramente que el cultivo debe ser iniciado con larvas que aún tienen reservas de vitelo (2 DDE). Inicialmente se pudo observar una sobrevivencia significativamente mayor para las larvas de vitelo (56 %) comparadas con las larvas sin vitelo (7 %). Por otra parte tanto el crecimiento en peso como en longitud presentaron un mayor incremento para las larvas con vitelo como se muestra en las siguientes graficas. Por lo anterior consideramos el grado de desarrollo de las larvas para iniciar su acondicionamiento al cultivo es determinante tanto en la sobrevivencia como en el crecimiento de las crías de catán.

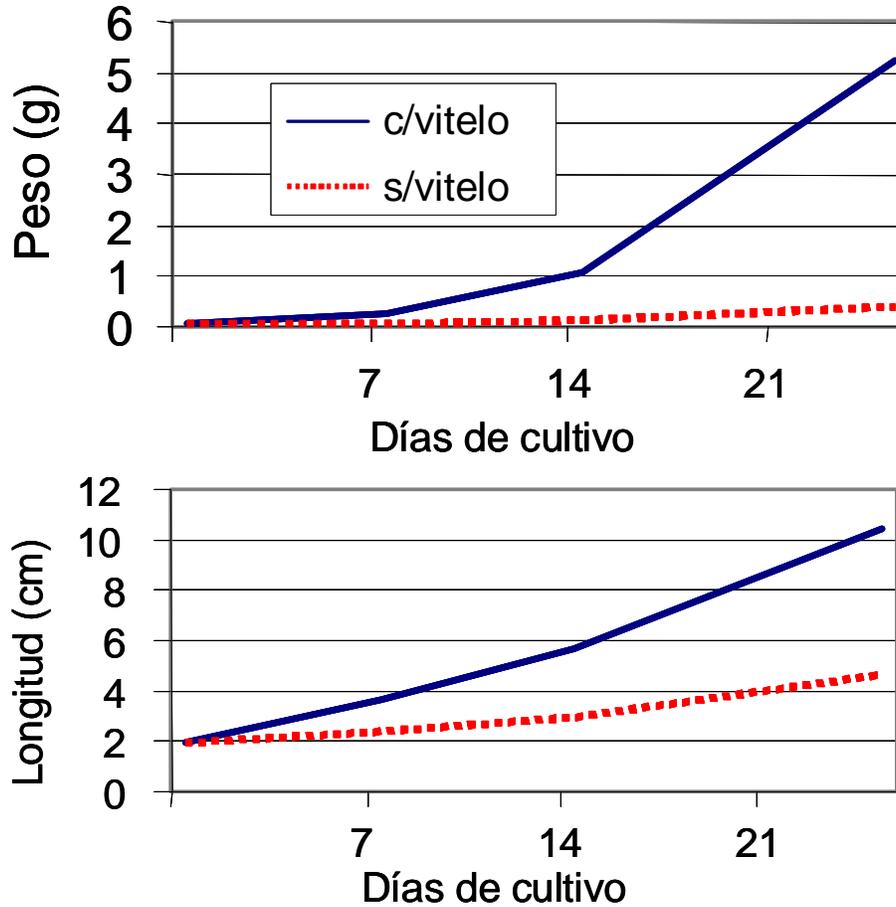


Figura 36.- Crecimiento en peso (g) y longitud (cm) de larvas de catán cultivadas con diferente fase de desarrollo. a) c/vitelo: larvas con vitelo de 2 DDE; b) s/vitelo: larvas sin vitelo de 7 DDE.

Determinación del sistema de cultivo

Los resultados de todas las variables mostraron claramente que el sistema de cultivo con tanques circulares resulta más apropiado para el cultivo de crías de catán. Estas diferencias se aprecian más claramente en el peso fresco total, seguido de la longitud total. Al mismo tiempo el mejor desempeño en las variables de longitud del hocico y altura preanal indican, respectivamente, que el desarrollo y la metamorfosis es más acelerado en los tanques circulares y que la condición nutricional de las larvas igualmente es mejor para este sistema comparado con el sistema de canaletas de fibra de vidrio .

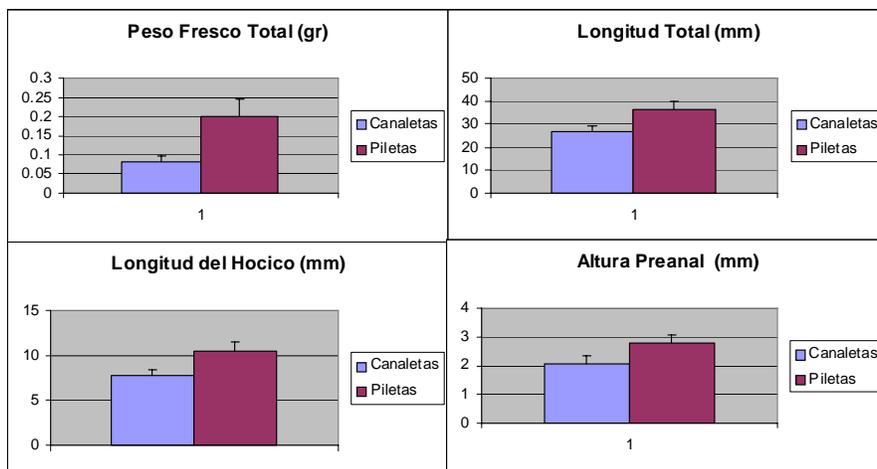


Figura 37.-Crecimiento Juveniles

Las variables de crecimiento mostraron un proceso de adaptación e incremento de los valores a lo largo del experimento, particularmente durante la última semana. De esta forma la tasa de crecimiento específico fue de 2.24 y 2.375 durante la primera y segunda semana para incrementarse hasta 3.18 en la tercera semana. Por su parte el factor de condición k al inicio del experimento fue de 1.02 y se incremento a 1.75 al final de la segunda semana y casi duplico este valor durante la última semana llegando finalmente a 3.01. Los valores de conversión alimenticia y eficiencia proteica igualmente muestran este proceso de adaptación con el mayor incremento durante la última semana de alimentación para finalizar en valores de 0.268 en RCA y 8.29 en REP

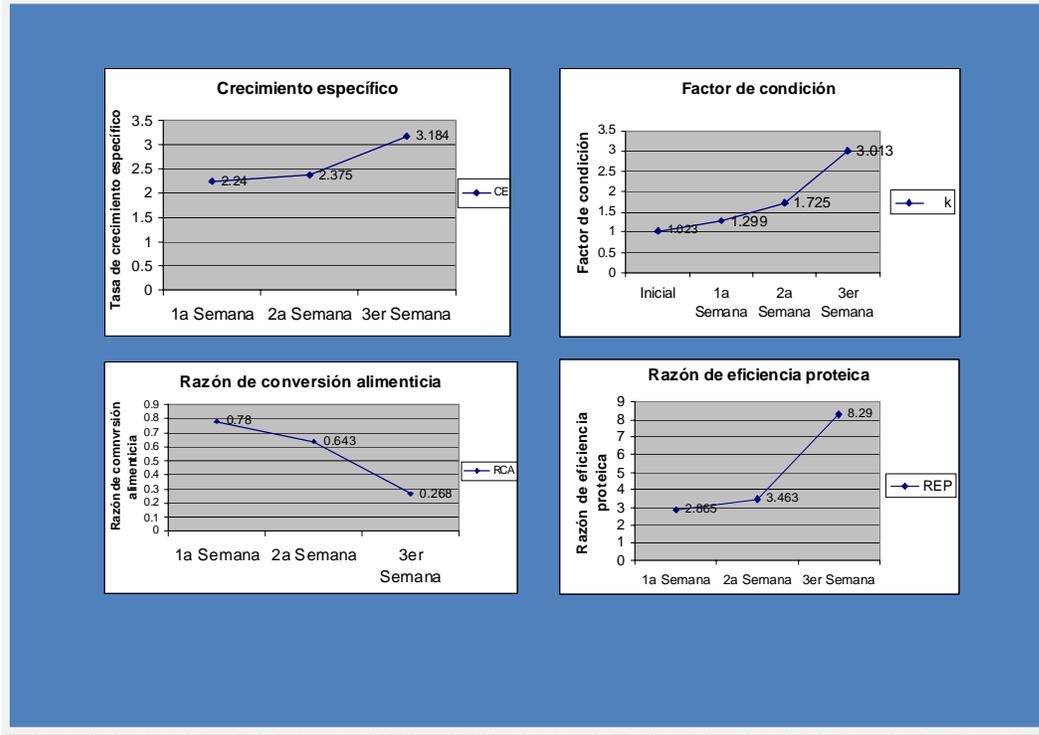


Fig 38.- Crecimiento específico, factores de (conversión y de condición) y valores de eficiencia

DISCUSIÓN

Los primeros ensayos con larvas de catán, entre 1997 y 1999, presentaban altas mortalidades cuando se utilizaban dietas artificiales. Por lo cual, la alimentación consistía únicamente de nauplios y adultos de *Artemia salina* y los bioensayos terminaban a los 15 DDE, antes de que el suministro de alimento afectara el crecimiento y la sobrevivencia, al alcanzar las larvas una talla máxima de 50 mm. No obstante, a finales de este periodo se definieron algunas de las características de las dietas, así como la posible estrategia para lograr la aceptación de las partículas de alimento artificial por las larvas de catán (Aguilera, 1999). Para el siguiente año, los primeros resultados positivos utilizando dietas artificiales fueron presentados (Mendoza y Aguilera, 2000; Mendoza *et al.*, 2002). En este bioensayo los primeros cuatro días de alimentación, la mortalidad fue muy pequeña en todos los

tratamientos, incluyendo aquellas larvas que no recibieron alimento exógeno (S). En primera instancia lo anterior se debe a que las larvas de catán cuentan con reservas de vitelo hasta alrededor de 8 DDE (Aguilera *et al.*, 2002). Esto les permitió, además de la sobrevivencia, que durante este periodo se presentaran las mayores tasas de crecimiento específico (26 a 31%) para los tratamientos que recibieron algún tipo de alimento, e inclusive, las larvas en inanición presentaron una tasa de crecimiento aceptable (12.6%).

El hecho de que el canibalismo solo se registrara en aquellos tratamientos en los cuales las larvas fueron alimentadas, podría explicarse en base al tamaño del hocico. Probablemente el canibalismo fue producto de la inadecuada frecuencia de alimentación, más que de la calidad de las dietas. A 10 DDE los tratamientos con mayor crecimiento fueron los que recibieron alimento vivo y microesferas (EM). Para el 20 DDE se observó que las larvas con alimento artificial continuaron creciendo (EM y EC). Lo anterior fue igualmente reflejado por indicadores morfométricos. Los resultados de esta investigación mostraron que los tratamientos a base de dietas artificiales tuvieron un mejor desempeño. Esto contrasta con la mayoría de los antecedentes, ya que, generalmente al comparar alimento vivo contra artificial se ha reportado un mejor desempeño para las larvas alimentadas con presas vivas (particularmente *Artemia*) (Person, 1990). A este respecto podemos señalar que las larvas que fueron alimentadas con presas vivas, dejó de mostrar un crecimiento sostenido entre el 9º y el 14º día de alimentación exógena. Este menor crecimiento puede ser explicado por el tamaño de alimento, el cual se vuelve rápidamente inadecuado considerando el acelerado desarrollo del hocico en las larvas de catán. Lo anterior implicaría que aunque las presas se encontraran en cantidad suficiente, las larvas invirtieran una gran parte de su energía en la búsqueda y captura de las mismas, con una recompensa energética menor que las larvas alimentadas con dietas artificiales,

considerando el tamaño creciente de las partículas alimenticias. A este respecto, la utilización de presas vivas en el cultivo de larvas de catán, significa, en la práctica, producir masivamente y de manera simultanea, presas vivas de diferente talla para realizar los cambios en el tiempo requerido (al menos cada cuatro días). Lo anterior implica un mayor número de instalaciones, más personal y operaciones y por consiguiente un mayor costo.

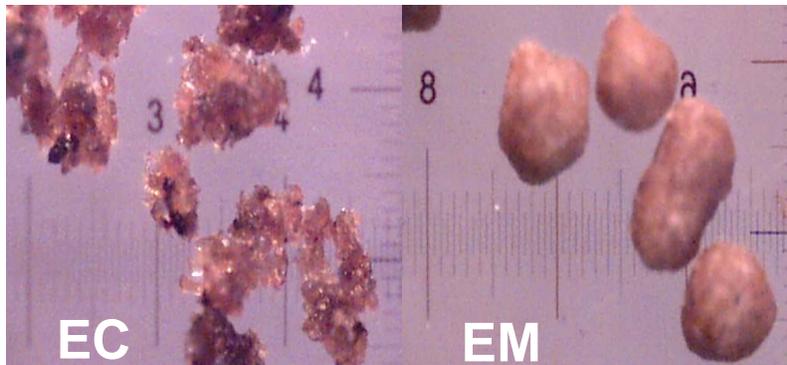


Fig. 39. Dietas utilizadas para alimentación de larvas de catán: Migajas de extrusión (EC); y Microesferas extruidas (EM)

Entre las dietas artificiales probadas, la EM presentó mejores resultados, sobre todo a los 10 y 14 DDE. Una diferencia entre las dietas utilizadas es el proceso de producción, el cual pudo ocasionar diferencias en la disponibilidad y por tanto en el consumo. A este respecto, ha sido señalado que las migajas de extrusión (EC) producen partículas de forma irregular con diferencias en su composición química lo que puede ocasionar un consumo selectivo por los peces (Figura 39) (Marr, 1999). Por otra parte, considerando que se plantea la flotabilidad de las partículas como una característica importante, se observó que a pesar de que la dieta EC presentó una mayor flotabilidad (45 a 70%), las partículas flotantes tienden a aglomerarse, perdiendo su forma y permanecen como manchas de alimento en la superficie. Mientras que la dieta EM, a pesar de presentar una flotabilidad menor a la señalada, las partículas no pierden su forma regular y pueden ser ingeridas individualmente mientras se encuentran flotando. Otra explicación podría darse por un exceso en el

suministro de proteína en la dieta EC (52%), en el caso de que este se encuentre por encima del requerimiento de las larvas de catán. Sin embargo, para confirmar lo anterior es necesario utilizar dietas elaboradas de la misma forma.

Se ha demostrado que es posible mantener larvas de peces empleando dietas artificiales, para lo cual han sido utilizadas principalmente tres estrategias para acondicionar larvas al consumo de dietas compuestas. Estas son el acondicionamiento directo el cual consiste en suministrar dietas compuestas desde el inicio de la alimentación, el acondicionamiento indirecto en el que se proporcionan dietas artificiales después de un periodo con alimento vivo y el acondicionamiento progresivo en el cual se incorporan cantidades graduadas de alimento vivo y artificial (Person-Le Rouyet, 1990). En este caso, la estrategia utilizada con larvas de catan fue el acondicionamiento directo. Sin embargo, esta estrategia generalmente se realiza en el caso de larvas de gran talla y ha sido utilizada en carpas y en larvas de salmónidos y esturiones (Dabrowski *et al.*, 1978, Dabrowski *et al.*, 1985).

En larvas de coregonidos (*Coregonus clupeaformis*), el acondicionamiento directo produjo problemas de scoliosis, lordosis y comportamiento de nado errático (Zitzow y Millard, 1988). En larvas de sparidos (*Sparus aurata*), este método provocó una reducción en el crecimiento y la sobrevivencia (Tandler y Kolkovski, 1991). Los problemas encontrados al utilizar esta estrategia de acondicionamiento han sido atribuidos a una baja calidad de huevos y larvas, a deficiencias nutricionales de la dieta, una baja afinidad de las enzimas proteolíticas hacia los sustratos artificiales ofrecidos en las dietas formuladas y a una baja tasa de ingestión de las partículas (Dabrowski y Culver, 1991; Dabrowski *et al.*, 1985; Zitzow y Millard, 1988; Kolkovski *et al.*, 1993)

La aceptación de dietas flotantes por larvas de catan es apoyada por el comportamiento alimenticio de los lepisosteidos, el cual consiste en permanecer inmóvil en la superficie del

agua hasta que la presa se encuentra a su alcance y con un movimiento lateral de la cabeza atraparla súbitamente (Suttkus, 1963). Igualmente, la adición de sustancias con características atractantes ayuda a la aceptación de la partícula, ya que hemos observado que una vez que la larva se encuentra cerca del alimento, esta puede permanecer cierto tiempo junto a este e inclusive tener contacto con el hocico antes de que lo ingiera, lo que indica que probablemente realiza un reconocimiento químico del alimento. Igualmente, lo anterior es apoyado por las observaciones de campo que indican una mayor actividad alimenticia durante la noche, lo cual limita la utilización de la vista, particularmente en aguas turbias de las ciénegas donde se desarrollan (Netch y Witt, 1962).

Hubo grandes diferencias encontradas entre las variables encontradas para el crecimiento de juveniles de catán y las reportadas para otras especies comerciales. La Tasa de Crecimiento Específico (CE) obtenido para el catán (*Atractosteus spatula*) fue de 3.184 gr/día, mientras que para la tilapia (*Sarotherodon nilotica*) es de 0.48 gr/día, para la lobina negra (*Micropterus salmoides*) es de 1.3 gr/día y para la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) es de 1.19 gr/día (FAO ONU, 1965). El Incremento de Longitud Promedio (IL) obtenido para el catán (*Atractosteus spatula*) es de 0.41 cm/día, cuando para la tilapia (*Sarotherodon nilotica*) es de 0.068 cm/día, para la lobina negra (*Micropterus salmoides*) es de 0.06 cm/día y para la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) es de 0.068 cm/día (Rubín, 1976). La Razón de Conversión Alimenticia, RCA, obtenida para el catán (*Atractosteus spatula*) fue de 0.268, para la tilapia (*Sarotherodon niloticus*) es de 1.92, para la lobina negra (*Micropterus salmoides*) de 1.24 y para la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) es de 1.67 (Winberg, 1971). Para el catán (*Atractosteus spatula*) la Razón de Eficiencia Proteica obtenida con un alimento de 40% de proteína fue de 8.29, mientras que la medida de la REP con la misma concentración de proteína para la Tilapia (*Sarotherodon niloticus*) es de 1.4, para la lobina

negra (*Micropterus salmoides*) es de 0.5, para la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) es de 1.7 (Hepher, 1993).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación el cultivo del catán (*Atractosteus spatula*) presenta ciertas ventajas sobre el cultivo de otras especies comerciales, el catán tiene un mercado establecido y su cría es relativamente fácil no así su reproducción, que necesita inducción al desove por hormonas, el catán tiene resistencia a altas concentraciones de sal y a turbidez de el agua, estas características lo hacen fácilmente cultivable. Las medidas comerciales exigidas por el mercado son de 20 a 25 cm, las cuales alcanzan la lobina (*Micropterus salmoides*), la carpa (*Cyprinus carpio*), el bagre (Fam. Bagrinos), la tilapia (*Sarotherodon niloticus*) y la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) en alrededor de 10 a 14 meses de nacidos, en contraste a eso el catán (*Atractosteus spatula*) alcanza los 25 cm después de los tres meses de nacido. El catán puede alcanzar los 1.5 kg al término de un año lo cual es todavía rentable para su cultivo. Esto representa un atributo innegable que lo distingue de las demás especies.

Esta investigación se originó por la necesidad de implementar cultivos de fauna autóctona que han demostrado tener un rendimiento superior a varias especies de peces importados, por lo que se espera que estos resultados contribuyan significativamente a la conservación del equilibrio ecológico, el cual se ha visto numerosas veces alterado al introducirse peces.

CAPITULO 5

FORMACION DE UN LOTE DE REPRODUCTORES

ANTECEDENTES

Estrategias para la domesticación de especies en acuicultura.

Debido a que la acuicultura es una actividad con un importante componente tecnológico, esta debe ser apoyada con trabajos de investigación que propicien su competitividad con otras alternativas de producción. De aquí, surge la necesidad de que la investigación de acceso a datos prácticos de carácter comercial que permitan ampliar constantemente el conocimiento y los medios técnicos disponibles. Por lo anterior, se requiere que las decisiones sobre los objetivos de investigación tomen en cuenta las opiniones de todos los participantes, y principalmente de la industria. Para esto, es indispensable profundizar en diferentes áreas que conlleven a un objetivo triple: primeramente orientar la investigación y el desarrollo al estudio de nuevas especies, así como a la optimización de las condiciones técnicas de los sitios de acuicultura, esto permitiría a su vez que los acuicultores se beneficiasen de información y recursos necesarios para resolver problemas cotidianos que puedan impactar de forma negativa su producción. Finalmente, los esfuerzos de investigación y desarrollo podrían desembocar en nuevos productos y tecnología de exportación (Mendoza y Aguilera, 1998).

Sin embargo, hasta el momento la acuicultura en México se ha venido desarrollando a partir de tecnologías importadas, que originalmente fueron diseñadas para especies exóticas. Esto ha traído como consecuencia un retardo considerable en la adaptación de las técnicas de cultivo para las distintas especies sobre las cuales reposa la acuicultura nacional. A esto se puede añadir el alto costo que ha

significado la sofisticación de este tipo de zootecnias, lo que ineludiblemente se ha traducido en el precio del producto final, destinado esencialmente a los mercados de exportación. Un ejemplo de lo anterior viene a ser reflejado en el hecho de que la investigación acuícola nacional haya sido orientada principalmente hacia el camarón, lo cual obviamente se deriva de la importancia económica que representa esta actividad. Así, de manera concomitante al desarrollo del cultivo de las distintas especies de camarón, las líneas de investigación prioritarias se han centrado básicamente sobre la nutrición y la sanidad acuícola, debido a que el alimento representa la mayor parte de los costos de operación de los cultivos, y por que hasta el momento la introducción sin control de larvas y reproductores de las mismas especies han venido diezmando año con año las distintas operaciones comerciales en torno al recurso camarón. Esto ha traído como resultado que la investigación hacia otras áreas y especies haya sido considerablemente reducida. Por consiguiente, es imperativo que se diversifique la investigación hacia la domesticación de las especies nativas, y en particular a su valorización. Esto será determinante para que las diferentes especies autóctonas, tanto marinas como de agua dulce, se vean beneficiadas en su desarrollo y uso en la acuicultura. De esta manera, mediante el fomento y fortalecimiento de los objetivos y programas de diversificación de la actividad hacia otras especies será posible coadyuvar a disminuir la presión sobre el recurso camarón (Álvarez-Torres *et al.*, 1996). Por otra parte, se evitaría el riesgo latente que representa la introducción de especies exóticas, así como la transfaunación de especies nativas

Domesticación

La incorporación de nuevas especies a la acuicultura implica desarrollar su domesticación. Este proceso involucra, al menos, la capacidad de aquellos

organismos de interés para vivir la mayor parte del ciclo de vida en condiciones artificiales e incluye además, adaptaciones genéticas al hacinamiento, manipulación y consumo de dietas artificiales. Normalmente también es de esperarse un mejoramiento genético con la finalidad de alcanzar un mayor crecimiento, modificar la forma del cuerpo y disminuir la conducta de huida producida por el estrés (FAO/PNUMA, 1984).

Criterios de selección

Como primera aproximación, se requiere definir la especie que se pretende domesticar tomando en cuenta aquellas características deseables que esta debe tener para ser sometida al proceso de domesticación. El IFREMER, una institución pionera a nivel mundial en el desarrollo de tecnología para acuicultura, definió los siguientes criterios para la selección de diferentes especies de peces susceptibles de ser sometidas a cultivo (AQUACOP y Calvas, 1989):

1. Facilidad o capacidad de reproducción y desove en cautiverio.
2. Posibilidad de realizar el cultivo masivo de larvas.
3. Adaptación y crecimiento con dietas artificiales
4. Habilidad para crecer al ser mantenida en altas densidades.

Sin embargo, resulta difícil encontrar todas estas características en la mayoría de las especies que hasta ahora han sido seleccionadas para la acuicultura, y en muchas de las ocasiones los motivos para iniciar la domesticación de una especie han sido relacionados con aspectos de otra índole, tales como los económicos (valor comercial de la especie), socio-culturales (pesquerías tradicionales) y ecológicos (especies sobre-explotadas o en peligro de extinción).

Una vez que ha sido definida la especie, es necesario abordar las diferentes etapas o puntos críticos identificados para lograr la domesticación. La constitución y

mantenimiento de un lote de reproductores es la fase primordial, ya que de ella dependerá la disponibilidad de larvas en cantidad suficiente, predecible y constante para asegurar el mantenimiento de la especie en condiciones de cautiverio.

Considerando este contexto, el presente capítulo está enfocado a la presentación de un esquema global de las principales estrategias o puntos críticos que surgen durante la constitución y mantenimiento de un lote de reproductores, particularmente de una especie nativa emergente en la acuicultura

Material y Metodos

Adecuación de Estanques Rústico

Una parte del estudio se desarrolló en la granja *Desarrollo Acuícola El Huasteco* localizada en el Mpo. de Gomez Farías Tams., en donde se realizaron adecuaciones a estanques rústicos de tierra pre-existentes, con la finalidad de utilizarlos como estanques de desove. Para este propósito, primeramente se dividió en dos partes iguales un estanque de 100 m X 50 m X 1.2 m promedio de profundidad, obteniéndose así dos estanques de 50 X 25 metros, lo que permitió un mejor mantenimiento de las condiciones del agua y manejo de animales.

Posteriormente, con la finalidad de tener mejor control de los desoves, y mayor número de repeticiones, se procedió a construir 6 estanques con las siguientes dimensiones 5 m x 25 m X 1.2m de profundidad. Estos estanques solo se utilizaron en el momento de la realización de los bioensayos relativos a la inducción de la reproducción, mientras que el resto del año se mantuvieron los organismos en un mismo estanque de 50 metros x 25 metros.

Para la preparación de los estanques rústicos, en general, se llevaron a cabo los

siguientes pasos

a.- Llenado de estanque: Se efectuó por medio de gravedad utilizando agua del distrito de riego 029 Del Rio Frío, Mpo. Gómez Farías.

b.- Fertilización: con la finalidad de incrementar la productividad primaria se utilizaron fertilizantes inorgánicos: superfosfato triple (20 Kg/ha) y urea (10 Kg/ha).

c.- Siembra de especies forrajeras: Se sembraron Tilapias (*Oreochromis mossambicus*) y Sardinas (*Astianax sp.*), producidas en la misma granja

Construcción de Estanques de Concreto en el Laboratorio

Con el mismo propósito, se construyeron dos estanques en el Laboratorio de Ecofisiología de la FCB de La UANL, para la obtención de desoves de los reproductores y la observación del desarrollo del catán en condiciones controladas. Estos estanques cuentan con las siguientes dimensiones 3 m x 6 m x 1.2 m de profundidad. Como medida precautoria se colocó una malla, tipo malla-sobra de uso agrícola de 70%, como techo cuya función principal fue la protección de aves depredadoras, así como para evitar la incidencia plena de los rallos solares que tienden a incrementar la temperatura del agua. Adicionalmente, los estanques cuentan con aeración suplementaria, para mantener los niveles deseables de oxígeno disuelto por arriba de las 6 ppm.

Captura de Ejemplares silvestres:

La etapa experimental inició con la captura de juveniles silvestres de catán en la Presa Vicente Guerrero y en dos presas particulares en el Edo. de San Luis Potosí en el poblado Tamuin. La colecta de ejemplares en el medio natural se llevo a cabo principalmente en los meses de mayor precipitación pluvial. Julio, Agosto y Septiembre, utilizando redes agalleras de hilo de nylon de seda del No. 6 y luz de

mallas de 5". Con este método resulta necesario revisar periódicamente la red, en virtud de que los organismos pueden morir algunas horas después de quedar atrapados (Morales, 1987), ya que requieren subir a la superficie para satisfacer su respiración aérea.

Una vez capturados, los individuos eran trasladados a una jaula de acopio. La jaula es de acero recubierto de PVC y con las siguientes dimensiones 3m x 1.2 m x 1.2m. La jaula cuenta con dos flotadores sujetos a lo largo de la parte superior de esta, permitiendo así que los organismos puedan emerger regularmente para llevar a cabo el proceso de respiración satisfactoriamente.

Posteriormente, y una vez que se contaba con un número suficiente de ejemplares (10 - 15), estos fueron trasladados en un transportador con equipo de aeración y de oxigenación (tanque mangueras y difusores). La temperatura del agua del transportador fue mantenida a 18°C con barras de hielo, lo anterior para disminuir el metabolismo de los organismos y evitar el stress. El transporte duró en promedio dos horas y media y durante el trayecto se realizaron monitoreos cada media hora para se checan los niveles de O₂ y temperatura.

Finalmente, los ejemplares fueron transportados a las instalaciones de la granja Desarrollo Acuícola "El Huasteco, en donde se cultivaron a una densidad de 5/m² y fueron alimentados con una dieta basada en calamar y pescado frescos, así como con las especies forrajeras sembradas con anterioridad.

Ejemplares cultivados en Laboratorio

De los animales originalmente acopiados en la granja El Huasteco, se trasladaron (en las mismas condiciones descritas previamente) 25 ejemplares al laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, mismos que se depositaron en los estanques de concreto arriba descritos. Aquí fueron alimentados

con una dieta comercial con 32% de proteína y con pescado y calamar frescos en los meses previos a la temporada de reproducción Abril – Mayo.

Marcado y Seguimiento de los reproductores

Para la identificación individual de los reproductores se utilizó un microchip, el cual fue introducido en la parte derecha superior del pedúnculo caudal, utilizando un dispositivo especial

RESULTADOS

Estanques para Mantenimiento de los Reproductores

Con la construcción de los estanques para reproductores actualmente se cuenta con una infraestructura instalada suficiente para mantener un stock de hasta 100 individuos, con los que se podrá garantizar por lo menos una producción anual de 100 a 150,000 crías.

Estanques de desove

A la fecha, en la granja se cuenta también con 6 estanques de 8 m X 25 m en donde se pueden obtener desoves en condiciones controladas y que permiten la experimentación de diferentes proporciones de géneros para garantizar la colecta de las larvas adheridas al sustrato previamente introducido a los estanques, para posteriormente trasladarlas a los estanques del laboratorio de Ecofisiología de la FCB de la UANL para llevar el proceso de alevinaje.

Estanques para alevinaje

La construcción de piletas de alevinaje en el Laboratorio de Ecofisiología de la FCB actualmente permite llevar a cabo las etapas más críticas con una supervisión estricta en el desarrollo de los alevines, lo que nos brinda mejores índices de

sobrevivencia, hasta un 50% de la población de crías a 5" de longitud.

Captura de Ejemplares silvestres:

Se obtuvieron un total de 45 ejemplares juveniles de las capturas realizadas en las cercanías de la Presa Vicente Guerrero en Tamaulipas. De estos juveniles 28 resultaron ser hembras y 17 machos, después de constatar su género por medio de pruebas inmunológicas como se describió en capítulos anteriores. Los animales mostraron inicialmente un peso promedio de 500gr y 60 cm de longitud total. Como resultado de otras capturas realizadas se obtuvieron 3 ejemplares de las presas de Tamuín SLP (una hembra y dos machos adultos con un peso 15.30 Kg y talla promedio 136.60 cm)

Marcado y Seguimiento de los reproductores

Los ejemplares fueron monitoreados durante un período de 5 años, periodo durante el cual se registraron los datos de incremento de peso y longitud, así como muestras de sangre para monitorear la presencia de vitelogenina en el caso de las hembras.

A la fecha, se cuenta con un stock de 39 reproductores (proporción) mismos que se encuentran en resguardo en la granja acuícola debido a las mejores condiciones climáticas.

Desempeño de los juveniles capturados y cultivados

Vale la pena hacer notar que de manera consistente se obtuvieron mejores resultados con los organismos mantenidos en la granja que aquellos mantenidos en las instalaciones del Laboratorio. Este desempeño se reflejo en el incremento de peso, como en la frecuencia de maduración. Los promedios de peso de los ejemplares registrados durante el período del año 2002 al 2006 fueron los siguientes:

TABLA XXXIX Peso promedio de los organismos año (2002-2006)

SITIO	2002	2003	2004	2005	2006
Huasteco	2.18 Kg	2.67 Kg	3.8 Kg	5.4 Kg	9.6 Kg
Lab. UANL	2.98 Kg	3.28 Kg	3.75 Kg	3.9 Kg	4.3 Kg

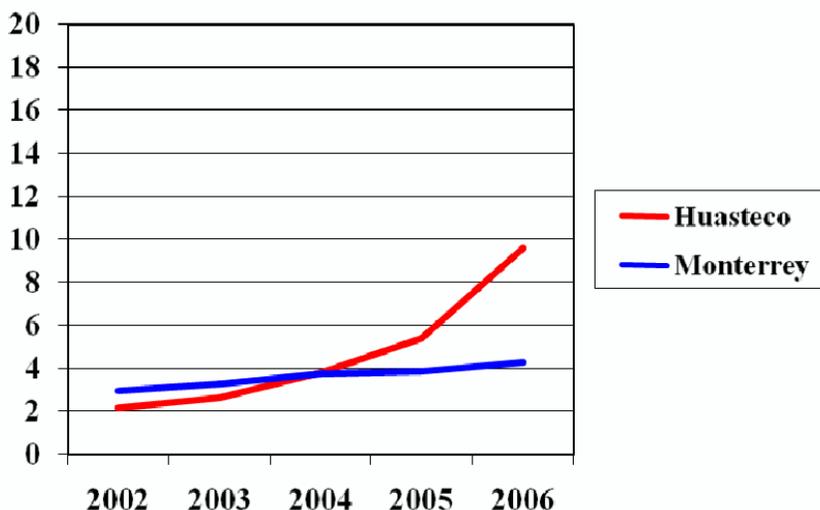


Fig 40.- Evolución ponderal de los organismos juveniles capturados y cultivados, mantenidos en la granja El Huasteco y en el Laboratorio de Ecofisiología de la UANL.

DISCUSION

Debido a la afectación de las existencias del catán, y tomando en cuenta los escasos ejemplares adultos existentes, (30 individuos inventariados) considerados como patrimonio de la Nación, resultaba difícil realizar estudios directos con estos organismos por lo cual era inminente la necesidad de constituir un lote de reproductores a partir de la captura eventual de juveniles silvestres y del cultivo de crías obtenidas en el laboratorio. El manejo y zootecnia de este lote giró en torno a la adecuación de distintos parámetros fisicoquímicos y biológicos, con miras a incrementar su capacidad reproductiva, lo que al mismo tiempo permitiría disponer de organismos en cantidad suficiente para realizar diversos ensayos de inducción hormonal.

El desarrollo del cultivo de nuevas especies para consumo humano o para repoblamiento generalmente implica la creación y el mantenimiento de stocks de reproductores en cautiverio. La constitución de un lote de reproductores, particularmente en el caso de una especie en proceso de domesticación, debe tener en cuenta su riqueza genética ya que esta condición permitirá tener mayor posibilidad de selección de organismos con características adecuadas a las condiciones de cultivo.

La finalidad de la formación de un lote de reproductores es múltiple, así se han venido constituyendo lotes de reproductores con fines de mejoramiento genético, para constitución de bancos de germoplasma en el caso de especies amenazadas o en peligro de extinción, o simplemente para facilitar el manejo de los mismos y poder programar la producción en el caso de las operaciones comerciales en las que la metodología ha permitido cerrar el ciclo de cultivo para evitar la dependencia de reproductores exclusivamente silvestres..

Aspectos genéticos

Desde el punto de vista de genético se justifica para mejorar el desempeño de la especie bajo cultivo, por medio de selección, retrocruza u otro tipo de manipulaciones (Chevassus, 1989).

En muchas ocasiones los stocks se forman a partir de una sola población de organismos, por ejemplo en el caso de requerir cierta garantía sanitaria (ausencia de, o resistencia a diversos patógenos), o bien para resguardar determinada población de enfermedades presentes en el medio con miras a repoblar posteriormente. Finalmente también se recurre a individuos de una población particular por el hecho de mostrar rendimientos excepcionales en la naturaleza.

Por otra parte, en diversas ocasiones se ha optado por integrar un stock de reproductores a partir de individuos de diversas poblaciones con la finalidad de incrementar la variabilidad genética intra-poblacional. Esta práctica se apoya en los siguientes argumentos:

- a) En el corto plazo se puede observar cierta relación entre la variabilidad genética del stock y su desempeño en el cultivo. Esta relación aunque no es sistemática, se presenta a menudo en acuicultura. Por ejemplo, se puede citar la relación entre heterocigocidad y la tasa de crecimiento en poblaciones de trucha (Ferguson *et al.*, 1985).
- b) En el largo plazo la capacidad de respuesta de una población a una perturbación ambiental esta clásicamente ligada a su nivel de variabilidad genética. Así, la domesticación, con o sin selección adicional de ciertos rasgos, constituye una importante prueba de adaptación, cuyo resultado final dependerá parcialmente en la diversidad genética inicial de la población

Especies amenazadas o en peligro

La necesidad de conservar los recursos genéticos de los peces ha sido una prioridad para los científicos relacionados con las pesquerías y para los acuicultores desde hace tiempo, especialmente en lo relativo a la sobre-explotación de las poblaciones naturales, a los efectos de las alteraciones a gran escala de los sistemas fluviales y a la domesticación de las especies a través de la acuicultura. El Simposio Mundial de la FAO sobre el Cultivo de Peces en Estanques de Aguas Tropicales (Roma, 1966) dio énfasis a la importancia de la selección genética y de la hibridación en el mejoramiento de las variedades de peces utilizadas para cultivo e hizo notar los problemas de la excesiva endogamia en las carpas cultivadas. La necesidad de un sistema internacional para la designación de líneas y stocks fue reconocida. En 1971,

la FAO estableció un grupo de trabajo ad hoc sobre los recursos genéticos de los peces, que recapituló los progresos logrados en la selección genética en la cría de peces, identificó áreas de prioridad para la investigación e hizo varias recomendaciones para la conservación de los recursos genéticos de los peces. Se hicieron sugerencias sobre la urgente necesidad de encontrar métodos para lograr lo anterior, sobre la preparación de un catálogo de los recursos genéticos en peligro de extinción de uso potencial en la acuicultura y sobre la conveniencia de emprender una colecta de especies silvestres de uso potencial. La Conferencia Técnica de la FAO sobre la Acuicultura, efectuada en Kyoto, Japón, del 26 de mayo al 2 de junio de 1976, reafirmó la necesidad de mantener la diversidad genética de los stocks propagados artificialmente, hizo notar que la transferencia indiscriminada de peces y moluscos en algunos casos ha tenido efectos adversos sobre las poblaciones autóctonas e invitó a incrementar la investigación sobre la genética de los peces, ya que existe una seria falta de información sobre este tema, lo que dificulta la formulación de programas de selección de cría. Por otra parte, la estabilidad de los sistemas ecológicos y el mantenimiento de la diversidad biológica (taxonómica) es un valor universalmente reconocido aunque a menudo se dé mayor prioridad a consideraciones sociales y económicas. Un método importante para mantener la estabilidad y la diversidad es el mantenimiento de la adaptación de las especies, particularmente de los consumidores dominantes de altos niveles tróficos. La escasez o extinción de tales especies constituye una pérdida de recursos genéticos y representa un peligro para la integridad de los ecosistemas.

Considerando este contexto, resulta crucial retener tanta variación genética como sea posible para tener oportunidad de restaurar poblaciones de especies en peligro de extinción (Hendrick *et al.*, 1999). En efecto, muchas especies enfrentan una gran

variedad de factores que amenazan a sus poblaciones con la extinción, y aún cuando estas amenazas se ven mitigadas su persistencia en el largo plazo va a depender en gran parte de lograr evitar la degradación genética como resultado de una eventual depresión genética. De aquí la necesidad de incluir organismos silvestres para incrementar la variabilidad genética.

Manejo del lote de reproductores

La constitución de un lote de reproductores representa una gran ventaja, particularmente por que permite tratar de manera diferente a los juveniles que se prepararan como adultos reproductores del resto. Esto implica proveer condiciones adecuadas no solo de densidad, sino de alimentación inclusive de suministro de hormonas. Por otra parte, se les puede dar un trato distinto a los machos de las hembras, lo cual es sumamente importante ya que las hembras requieren más cuidado y una dieta más especial, debido a que de su fisiología dependerá la formación de las reservas del embrión y por ende la sobrevivencia de las larvas (Badger, 2004). A los reproductores mantenidos en cautiverio se les debe proveer con una dieta que no solo resulte adecuada para satisfacer sus demandas metabólicas, sino para prepararlos para el proceso reproductivo

Efectos negativos de la domesticación

La diferencia en el desempeño de los juveniles mantenidos en la granja con respecto a aquellos mantenidos en el Laboratorio de Ecofisiología no se puede explicar únicamente en base al origen de los organismos, ya que que independientemente de ser silvestres o cultivados los juveniles tuvieron un mayor incremento ponderal y maduraron con más frecuencia. Las causas probables son el alimento, ya que a pesar de tratarse en ambos casos de calamar y pescado frescos, el origen de estos difirió. A este respecto, existen antecedentes que señalan que en el

caso particular de los moluscos, y especialmente el calamar, debido a su capacidad de bioacumulación de nutrientes, su composición química a nivel corporal se vería reflejada de acuerdo al área en donde habitan y por ende en donde son pescados (Mendoza *et al.*, 1997). A esto cabe agregar un elemento fundamental que es la productividad primaria. En efecto, es del conocimiento común las bondades del zoo y fitoplancton con respecto al aporte de elementos esenciales para el proceso de maduración, como son ácidos grasos esenciales y hormonas (Gallardo *et al.*, 2006). Otra posible causa es la estructura de los tanques. Los catanes al ser organismos enterradores, posiblemente no encontraron condiciones adecuadas en los tanques de concreto para su óptimo crecimiento. Finalmente no se puede descartar la densidad, la cual por el tamaño de los estanques siempre fue menor que en el caso de la granja.

En el mismo sentido, existen asimismo, argumentos en contra la formación de lotes de reproductores en cautiverio. Así, se ha considerado que los peces cultivados en condiciones de cautiverio son particularmente susceptibles a desarrollar deformidades (Brown y Nuñez, 1998). Una de las razones es el incremento en la supervivencia de los individuos poco adaptados, física o comportamentalmente, los que estarían sujetos a enfermedades o predación bajo condiciones normales (Sinderman, 1988). Igualmente, algunas deformidades suelen notarse en cautiverio debido a la inestabilidad inherente de los sistemas artificiales en donde se llevan a cabo los cultivos (Wolters, 1993). Los sistemas de cultivo artificiales pueden exponer a las larvas en desarrollo a una variedad de condiciones ambientales sub-óptimas, muchas de las cuales están asociadas con la inducción de deformidades. Esto a pesar de que en la mayor parte de los laboratorios de larvicultivo están diseñados para replicar las condiciones del medio ambiente natural, no obstante la mayor parte de los parámetros está basada en ensayo y error o en suposiciones de los requerimientos

físicos de la especie en particular. De tal manera que en la mayoría de las operaciones comerciales se tratan de mantener condiciones físico-químicas constantes, cuando en realidad se requiere de regímenes variables, similares a los registrados en la naturaleza, para que se lleve a cabo un desarrollo adecuado (Sicard, 2007). Así, por ejemplo algunas larvas pelágicas llevan a cabo migraciones diurnas a profundidades considerables en la naturaleza (John y Kloppman, 1989), con la consecuente exposición a un aumento de la presión hidrostática indispensable para su desarrollo (Siebenaller, 1984). Por esta razón el cultivo del halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) se lleva a cabo en silos de varios metros de profundidad en Noruega.

Aún en sistemas de cultivo optimizados y presumiblemente bien balanceados pueden emerger problemas de deformidad después de varias generaciones si se ve comprometida la diversidad genotípica. Debido a la alta tasa de fecundidad de la mayor parte de las especies los cultivos reposan en solo un pequeño número de reproductores con características atractivas. Esto a menudo resulta en una carga o depresión genética (inbreeding load ó inbreeding depression). Esto implica la reducción de la variabilidad genética dentro de una población al disminuir la heterocigocidad, ya sea por un aumento en la probabilidad de de compartir genes parentales o la pérdida de alelos a partir de una deriva génica aleatoria. Esto a su vez trae como consecuencia una reducción del valor fenotípico medio de uno o más rasgos con respecto a la capacidad de adaptación (Wang *et al.*, 2001). La depresión genética es a menudo más severa en rasgos relacionados con la adaptación que tienen muchos loci con efectos genéticos no aditivos. Típicamente, la supervivencia de los embriones y el desarrollo temprano son los más afectados (Keller y Waller, 2002), no

obstante la depresión génica también afecta rasgos que se expresan más tarde como la longevidad (Oosterhout *et al.*, 2000).

La domesticación puede redundar en varias características que hacen no solo diferente a los peces criados en cautiverio, sino en ocasiones menos aptos para sobrevivir en la naturaleza, lo cual puede ser crítico si se vislumbran programas de repoblación. Por ejemplo, aquellos peces cultivados en altas densidades tendrán una relación edad/talla diferente a la de los silvestres, haciendo difícil o poco probable su reproducción con estos. Los peces cultivados también pueden diferir en el color o en la forma con los silvestres debido a factores nutrimentales y por lo general aquellos peces cultivados en condiciones artificiales serán incapaces de reconocer o evitar a sus predadores o competidores.

Los efectos de la domesticación pueden igualmente repercutir a nivel comportamental. Así por ejemplo aquellos peces a los que se les adiestra para obtener su alimento a voluntad a partir de alimentadores automáticos, se espera que estén menos adaptados para buscar alimento en la naturaleza

Por otra parte, la ventaja de contar con una variabilidad suficiente desde el origen es no tener que reintroducir continuamente individuos de esa población. Así, por ejemplo en el caso del turbot *Scophthalmus maximus*, varios individuos han tenido que ser introducidos repetidamente de Europa hacia China debido a la pérdida de “buenas” características (e.g. calidad de la carne, tasa de crecimiento) después de dos generaciones mantenidas en cautiverio, y la manifestación de “malas” características (e.g. maduración temprana y albinismo) (Liu *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

- Es posible realizar la identificación del sexo de ejemplares adultos de *Atractosteus spatula* 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 E₂, y hembras maduras de catán y pejelagarto, lo cual confirma que la proteína purificada es similar en ambas especies.
- La identificación del sexo de esta especie empleando la VTG como marcador, 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- D-Ala*⁶–*LHRHa*) y Ovaprim, pueden ser empleados como agentes inductores del desove en *A. spatula*, 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
- La constitución del lote de reproductores fue exitosa, permitiendo hasta la fecha varios desoves y se vislumbra un periodo largo de funcionamiento gracias al aporte de juveniles de diferentes procedencias
- Las etapas secuenciales de purificación de la VTG adoptadas en el presente estudio fueron adecuadas para obtener una molécula suficientemente pura.
- El protocolo de inducción de los anticuerpos y su purificación subsecuente permitieron no sólo obtener líneas individuales de precipitación, sino eliminar los problemas de especificidad registrados en estudios anteriores.
- La estandarización del inmunoensayo cumple con las expectativas planteadas en los objetivos, *i.e.* se cuenta con una herramienta bioquímica precisa, sensible y no invasiva, adecuada para determinar el sexo de los ejemplares de *A. spatula* y capaz de determinar el grado de madurez sexual de las hembras.
- Los parámetros de sensibilidad, reproductibilidad y recuperación del ELISA presentado en este trabajo fueron similares a los reportados por otros autores, por lo que se considera un ensayo confiable para medir la VTG en catán
- Para un óptimo crecimiento las larvas y juveniles de catán deben ser de preferencia cultivados en tanques redondos
- La primera alimentación exógena debe iniciarse cuando las larvas aún posean reservas de vitelo
- Dentro de los aspectos claves de la dieta para las larvas de esta especie destacan la flotabilidad, textura e inclusión de atractantes

Los juveniles de esta especie presentan mejores tasas de crecimiento, de eficiencia de conversión alimenticia y de utilización de la proteína que los de otras especies

Las especies nativas, como el catán, ofrecen un gran potencial para el medio ambiente y la acuicultura, por lo cual debe privilegiarse su investigación

LITERATURA CITADA

- Aguilera C, Mendoza R, Rodriguez G, Marquez G. 2002. Morphological description of alligator gar and tropical gar larvae, with an emphasis on growth indicators. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 131, 899-909.
- Aguilera C. 1999. Bases fisiológicas del desarrollo de larvas de catán (*Atractosteus spatula*) y perspectivas para su cultivo. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L. Monterrey, N. L., pp.186.
- Ako H, Tamaru CS, Lee C. 1994. Chemical and physical differences in milkfish (*Chanos chanos*) eggs from natural and hormonally induced spawns. *Aquaculture* 127: 157-167.
- Alemán L, Contreras W. 1987. Algunas consideraciones ecológicas sobre el pejelagarto *Lepisosteus tropicus* y sus hábitos alimenticios. Resúmenes IX Congreso Nacional de Zoología. Univ. Juárez Autónoma. Tabasco. 1:127.
- Alvarez-Lajonchère L, Guerrero-Tortolero D, Pérez-Urbiola JC. 2001. Validation of an ovarian biopsy method in sea bass, *Centropomus medius* Günther. *Aquaculture Research* 32: 379-384.
- Alvarez-Torres P, Soto F, Avilés S, Díaz C, Treviño L. 1996. Panorama de la investigación y su repercusión sobre la producción acuícola en México. In: Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cruz-Suarez, D. Rique y R. Mendoza Editores. Monterrey, N.L. pp: 3-20.
- Chevassus, B. (1989). Constitution of aquacultural stocks: genetic aspects. *Advances in Tropical Aquaculture*. Tahiti, Feb. 20- March 4, 1989. Aquacop, IFREMER. Actes de Colloque 9. Pp 569-592.
- Appelbaum S. 1985. Rearing of the dover sole, *Solea solea* (L), through its larval stages using artificial diets. *Aquaculture* 49, 209-221
- AQUACOP, Calvas J. 1989. The state of the art of IFREMER in tropical aquaculture. *Advances in Tropical Aquaculture*. 9:1-9.
- Backhurst JR, Harper JH. 1988. The settling rates of larval feeds. *Aquaculture Engineering*, 7:363-366.
- Badger A. 2004. The effects of nutrition on reproduction in the Eastern rainbowfish *Melanotaenia splendida splendida*. M.S. Dissertation, School of Marine Biology and Aquaculture, James Cook University. pp 119
- Baskerville-Bridges B, Kling LJ. 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture Nutrition* 6: 171-182.
- Bejerano G, MARQUEZ G, PARAMO S. 1997. Propuesta metodológica para la inducción al desove del pejelagarto *Atractosteus spatula*. Memoria de la

Semana de divulgación y video científico 1997. Secretaría de Servicios Académicos. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. pp. 80-83.

- Benfey TJ, Donaldson EM, Owen TG. 1989. An Homologous Radioimmunoassay for Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Vitellogenin, with General Applicability to Other Pacific Salmonids. *General and Comparative Endocrinology* 75: 78-82.
- Benitez J. 1992. Estructura histológica de la gónada de los teleósteos. Temas actuales sobre reproducción de teleósteos., Rodríguez, M. (ed)., SEPESCA-UAM, México .pp 13-22
- Bjornsson BT, Halldorsson Ó, Haux C, Norbeg B, Brown CL. 1998. Photoperiod control of sexual maturation of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): plasma thyroid hormone and calcium levels. *Aquaculture* 166: 117-140.
- Bon E, Barbe U, Nuñez J, Cuisset B, Pelissero C, Sumpter J P, Le Menn F. 1997. Plasma Vitellogenin Levels During the Annual Reproductive Cycle of the Female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Establishment and Validation of an ELISA. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B(1): 75-84.
- Bradford MM, 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.
- Bromley PJ, 1978. The weaning of hatchery reared turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) on a dry diet. *Aquaculture* 13, 339-345.
- Brown CL, Nuñez JM. 1998. Disorders of development. In: CAB INTERNATIONAL (eds. J.F. Leatherland and P.T.K. Woo), *Fish Diseases and Disorders. Vol. 2. Non Infectious Disorders.* pp1-17
- Brzuska E, Adamek J. 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.
- Buddington RK. 1985. Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. *Journal of Fish Biology.* 26, 715-723.
- Callard, IP, Riley D, Perez L. 1990. Vertebrate Vitellogenesis: Molecular Model for Multihormonal Control of Gene Regulation. *Progress in Comparative Endocrinology*, 343-348.
- Campbell CM, Idler DR 1980. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological crossreactivity to ovarian yolk fractions. *Biology Reproductive.* 22: 605-617.

- Carnevali O, Belvedere P. 1991. Comparative studies of Fish, Amphibian and Reptilian Vitellogenins. *The Journal of Experimental Zoology* 259:18-25.
- Catty D, Raykundalia C. 1989. Gel Immunodiffusion, Immunoelectrophoresis and Immunostaining Methods. In: Chapter 6. Antibodies Volume I. A Practical Approach. David Catty Ed. pp. 203.
- Chan SL, Tan CH, Pang MK, Lam TJ. 1991. Vitellogenin purification 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 CF, Lau EL, Lin BY, Jeng SR. 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, Mattheeuws A, Pérez M. 1989. Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura. INIREB-FUCID. Xalapa, Veracruz, México. 222p.
- Chávez-Lomelí MO, 1989. Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para piscicultura. Instituto de Investigaciones sobre Recursos Bióticos y la Fundación Universitaria para la cooperación, Jalapa, Ver. 90 pp.
- Cheah, MS, Lee CL, 2000. Induced Ovulation of the Australian Eel-tailed Catfish *Neosilurus ater* (Perugia) with Ovaprim. *Asian Fisheries Science* 13: 87-96
- Chiba H, Iwatsuki K, Hayami K, Hara A, Yamauchi K. 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.
- Clark, BR, Engvall E, 1987. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Theoretical and Practical Aspects. In: Enzyme-Immunoassay. Edward T. Maggio ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 167-179.
- Clausen J. 1988. Immunochemical Techniques For the Identification and Estimation of Macromolecules. 3rd. Edition, Volume 1, Part 3 of series Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. pp 181-213.
- Colunga-Almazán TJ, 1996. Inducción al desove del catán (*Lepisosteus spatula*) mediante la aplicación de Gonadotropina Coriónica Humana (HCG). Instituto Tecnológico del Mar, SEP; Boca del Río, Ver.
- Contreras SW, Schreck CB, Fitzpatrick MS, Pereira CB. 1998. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction* 58: 439-447.

- Contreras W. 1987. Aspectos reproductivos y desarrollo embrionario del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) en el Estado de Tabasco. pp. 57.
- Contreras W, Márquez G, García JL. 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.
- Copeland PA, Sumpter JP, Walker TK, Croft M. 1986. Vitellogenin Levels in Male and Female Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at Various Stages of the Reproductive Cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B(2): 487-493.
- Copeland PA, Thomas P. 1988. The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*), by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B: 17-23.
- Cortes V. 2000. Purificación y caracterización de la vitelogenina plasmáticas y vitelina ováricas del cangrejo de río *Procambarus clarkii* (GIRARD, 1852) (Crustacea decapoda). Tesis de Licenciatura de la Universidad Autónoma de Nuevo León. 64 pp.
- Cortes V. 2003. Purificación y Caracterización de la Lipovitelina Ovárica de Ejemplares Adultos de *Atractosteus spatula*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, p. 58.
- Covens M, Covens L, Ollevier F, A. De Loof. 1986. A comparative study of some properties of vitellogenin (Vg) and yolk proteins in a number of freshwater and marine teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88B: 75-80.
- Craik JC, Harvey SM. 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 LW, Evans DM, Vickery BH. 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.
- Cuisset B, Pelissero C, Le Menn F, Núñez-Rodríguez J. 1991. ELISA for Siberian Sturgeon (*Acipenser Baeri* Brandt) Vitellogenin. In: *Acipenser*. P. Williot Ed. Cemagref Publ. pp. 107-111.
- Dabrowski K, Culver D. 1991. The physiology of larval fish, digestive tract and formulation of starter diets. *Aquaculture Magazine* March/April: 49-61.
- Dabrowski KR. 1986. Ontogenical aspects of nutritional requerimients in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85A(4),639-655.
- Dabrowski K, Dabrowska H, Grudniewski C. 1978. A study of the feeding of

common carp larvae with artificial food. *Aquaculture*, 13:257-264.

Dabrowski K, Kaushik SJ, Fauconneau B. 1985. Rearing of sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) larvae I. Feeding Trial. *Aquaculture*, 47:185-192.

De Vlaming LV, Wiley SH, Delahanty G, Wallace RA. 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B: 613-623.

Dean B, 1895. The early development of gar-pike and sturgeon. *Journal of Morphology*; 11(1): 1-53.

Devresse B, Candreva P, Sorgeloos P. 1991. A new artificial diet for the early weaning of seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. In: Larvi 91 - Fish and crustacean larviculture symposium, European Aquaculture Society, Special Publication, 15, 178-182.

Doroshov SI, Moberg GP, Van Eenennaam JP. 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Environmental Biology of Fishes* 48: 265-278.

Drori S, Ofir M, Levavi-Sivan B, Yaron Z. 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.

Duray M, Bagarinao T. 1984. Weaning of hatchery-bred milkfish larvae from live food to artificial diets. *Aquaculture* 325-332.

Echelle AA, Riggs CD. 1972. Aspects of the early life history of gars (*Lepisosteus*) in Lake Taxoma. *Transactions of the American Fisheries Society* 101, 106-112.

FAO/PNUMA. 1984. Conservación de los recursos genéticos de los peces: Problemas y recomendaciones. Informe de la consulta de expertos sobre los recursos genéticos de los peces. FAO. Doc. Tec. Pesca, (217): 42p.

Ferrara AM, Irwin ER. 2001. A standardized procedure for internal sex identification in Lepisosteidae. *North American Journal of Fisheries Management* 21(4): 956-961.

Flett PA, Leatherland JF. 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.

Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. 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.

- Francis T. 1996. Studies on the effect of pituitary hormones and feeds on the reproduction of *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Tesis de Doctorado. Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, Madras, India. pp 205
- Fujita T, Takemura A, Takano K. 1998. Immunochemical detection of precursor proteins yolk and vitelline envelope, and their annual changes in the blood of *Diodon holocanthus*. *Journal of fish biology* 52:1229-1240.
- Gallardo WG, Hagiwara A, Hara K, Soyano K. 2006. Growth hormone-like substance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fisheries Science*, Volume 72 (4):781-786
- Gómez MA. 1987. Reproducción del pejelagarto en estanquería rústica. I Seminario sobre acuacultura PEMEX-UJAT en el Estado de Tabasco. Univ. Juarez Autón. Tabasco. 1:13
- Goudie CA, Simco BA, Davis KB, Parker NC. 1992. Reproductive performance of pigmented and albino female channel catfish induced to spawn with hCG or Ovaprim. *Journal of the World Aquaculture Society* 23(2), 138-145.
- Gwo JC, Strawn S, Arnold CR. 1993. Induced ovulation in atlantic croaker (scianidae) using hCG and LHRH analog: a preliminary study. *Theriogenology*. 39: 353-361.
- Hamazaki TS, Iuchi I, Yamagami K. 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.
- Haniffa MA, Merlin RT, Francis T. 2000. Induced spawning of the striped murrel *Channa striatus* using pituitary extracts, human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone releasing hormone analogue and ovaprim. *Acta Ichth. Piscat.* 30, 53-60.
- Heppell SA, Sullivan CV. 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.
- Hernández U. 2002. Identificación del Sexo y Evaluación de la Inducción Hormonal en el Pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, p. 84.
- Hickey ED, Wallace RA. 1974. A study of the vitellogenic protein in the serum of estrogen-treated *Ictalurus nebulosus*. *Biology Bulletin* (Woods Hole, Mass); 147, 181 pp.
- Hiramatsu N, Shimizu M, Fukada H, Kitamura M, Ura K, Fuda H, Hara A. 1997. Transition of Serum Vitellogenin Cycle in Sakhalin Taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.* 118C(2): 149-157.

- Ho SM. 1987. Endocrinology of Vitellogenesis. In: Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles. Norris, D. O. and Jones, R. E. (eds.) Plenum Press, N. Y., 145-169 pp.
- Holloway A. 1954. Notes on the life history and management of the shortnose and longnose gars in Florida waters. *Journal of Wildlife Management*. 18(4): 440-449.
- Hoque M, Takemura A, Takano K. 1998. Annual Changes in Oocyte Development and Serum Vitellogenin Level in the Rabbitfish *Siganus canaliculatus* (Park) in Okinawa, Southern Japan. *Fisheries Science* 64(1): 44-51.
- Hori SH, Kodama T, Tanahashi K. 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *General and Comparative Endocrinology*, 37: 306-320.
- Inaba K, Corazon C, Buerano F, Natividad F, Masaaki M. 1997. Degradation of Vitellogenins by 170 kDa Trypsin-Like Protease the plasma of the Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118B, 85 - 90.
- John HC, Cloppman M. 1989. Ontogenetic changes in the vertical distribution of larval *Maurolicus muelleri*, *Archiv for Fischereiwissenschaft* 39, 79 - 93
- Kanungo J, Petrino TR, Wallace RA. 1990. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. VI. Establishment and verification of conditions for vitellogenin incorporation by oocytes in vitro. *The Journal of Experimental Zoology*; 254: 313-321.
- Kather MA, Sridhar S. 2002. Induced spawning of spotted murrel (*Channa punctatus*) and catfish (*Heteropneustes fossilis*) using human chorionic gonadotropin and synthetic hormone (ovaprim). *Veterinarski Arhiv* 72 (1), 51-56,
- Khoo KH. 1979. The histochemistry and endocrine control of vitellogenesis in goldfish ovaries. *Canadian Journal of Zoology* 57: 617-626.
- Kishida M, Specker JL. 1994. Vitellogenin in the surface mucus of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*); possibility for uptake by the free-swimming embryos. *The Journal of Experimental Zoology*; 268: 259-268.
- Kishida M, Specker J.L. 1994. Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Induction of two forms by estradiol, quantification in the plasma, and characterization in plasma and mucus. *Fish Physiology and Biochemistry* 12, 171-182.
- Kishida M, Anderson TR, Specker JL 1992. Induction by β -Estradiol of Vitellogenin in Striped Bass (*Morone saxatilis*): Characterization and Quantification in Plasma and Mucus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 29-39.

- Kolkovski S, Tandler A, Kissil G, Gertler A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. 12 (3): 203-209.
- Komatsu M, Matsumoto W, Hayashi S. 1996. Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B (3): 561-571.
- Kucharczyk D, Kujawa R, Luczynsky M, Glogowski J, Babiak I, Wyszormirska E. 1997. Induced spawning in bream *Abramis brama* (L.), using carp and bream pituitary extract and hCG. *Aquaculture Research* 28:139-144.
- LaFleur GJ, Byrne BM, Kanungo J, Nelson LD, Greenberg RM, Wallace RA. 1995. *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: the deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *Journal of Molecular Evolution*; 41: 505-521.
- Lam TJ. 1985. Induced spawning in fish. *Reproduction and culture of milkfish*. Oceanic Institute, Hawaii and Tungkuang Marine Laboratory, Taiwan., Lee, C. S. and Lio, I. C. (eds), 14-56.
- Lancaster PM, Tyler CH. 1994. Developmental expression and modulation of the vitellogenin receptor in ovarian follicles of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Zoology*; 269: 458-466.
- Le Bail PY, Preton B. 1981. Reapid determination of the sex of puberal salmonid fish by a technique of immunoagglutination. *Aquaculture* 22:367-375.
- León RR, Aguilar Y, Hernández Y. (1978). Estudio sobre la biología y el cultivo artificial del manuari (*Atractosteus tristoechus*) Bloch and Schneider. *Acuicultura*. Ministerio de la Industria Pesquera de Cuba, Dir. Ramal de Acuicultura. INVESTIGACS. 35 pp.
- Linares-Casenave J. 1990. 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.
- Liu SL, Wang FQ, Yang M, Wang JY, Yang JJ, Huang ZL. (2003). Investigation and study on the alien species in aquaculture in Shandong Province. *Marine Fisheries Research* 24(3): 66-71.
- Maitre JL, Le Guellec C, Derrien S, Tenniswood M, Valotaire Y. 1985. Measurement of Vitellogenin from Rainbow Trout by Rocket Immuno-electrophoresis: Application to the kinetic Analysis of Estrogen Stimulation in the Male. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63: 982-987.

- Mañanós E, Nuñez J, Zanuy S, Carrillo M, 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, Zanuy S, Le Menn, Carrillo M, Nuñez J. 1994b. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I- Induction, purification and partial characterization. Comp. Biochem. Physiol. 107B(2): 205-216.
- Márquez H. 1998. Efectos de la temperatura en el desarrollo de embriones y en crecimiento de las larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus* bajo condiciones de Laboratorio. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tabasco, México. 43p.
- Matsubara T, Sawano K. 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, Honda S, Wada T, Soyano K, Hara A. 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, Wada T, Hara A. 1994. Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). Comp. Biochem. Physiol. 109B (4): 545-555.
- Matsubara, T, Ohkubo N, Andoh T, Sullivan CV, Hara A. 1999. Two forms of Vitellogenin, yielding two distinct Lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of Barfin Flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. Developmental Biology. 213: 18-32.
- Mayes KB, Rosenblum PM, Brandt TM. 1993. Raceway spawning of florida largemouth bass: effects of acclimatation time and hormone treatment on spawning success. The progressive fish-culturist 55 (1): 1-8.
- Mendoza R, Aguilera C, Rodríguez G, González M, Castro R. 2002. Morphophysiological studies on alligator gar (*Atractosteus spatula*) larval development as a basis for their culture and repopulation of their natural habitats. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 12: 133-142.
- Mendoza R, Revol A, Fauvel C, Patrois J, Guillaume JC. 1997. Influence of squid extracts on the triggering of secondary vitellogenesis in *Penaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition. 3: 55-63
- Mendoza AE, Páramo S, Contreras W, Márquez G. 1993. Alternativas de desarrollo piscícola para el manejo de áreas inundadas. Tabasco: Realidad y Perspectivas. Tomo III. Economía y Desarrollo. Gobierno del Estado de Tabasco. Editorial Porrúa. pp. 263-303.

- Mendoza R, Aguilera C. 2000. Morpho-physiological studies on alligator gar *Atractosteus spatula* larval development as a basis of their weaning onto artificial diets. 24th Annual Larval Fish Conference. Alabama.
- Mendoza R, Aguilera C. 1998. Acuacultura: El contexto educacional y de la investigación en México y Canadá. In: Estudios Canadienses en México. R. Reboloso y R. Mendoza Editores. Monterrey, N.L. pp. 147-166.
- Mommsen TP, Walsh PJ. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Fish Physiology. Hoar, W. S. and D. J. Randall Eds. Academic Press, London. XIA: 347-406.
- Morales G. 1987. Reproducción y desarrollo embriológico del catán (*Lepisosteus spatula* Lacepede) Primeros resultados. Secretaría de Pesca. Manual Técnico para el Aprovechamiento de Existencias Silvestres. pp 41 - 70.
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon FJ, Sarasquete MC. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry. 15 (2): 121-130.
- Mylonas CC, Hinshaw JM, Sullivan CV. 1992. GnRH-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. Aquaculture 106: 379-392.
- Nagahama Y. 1987. Endocrine control of oocyte maturation. Hormones and reproduction in fishes, amphibian and reptiles. Norris D. O. and Jones R. E. (eds.) Plenum Press, N.Y., 171-203.
- 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, Yoshikuni M, Yamashita M, Sakai N, Tanaka M. 1993. Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation on fish. Fish Physiology and Biochemistry 11(1-6): 3.14.
- Nagler JJ, Ruby SM, Idler DR, So YP. 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.
- Nandeesh MC, Rao KG, Jayanna RN, Parker NC, Varghese TJ, Keshavanath P, Shetty HP. 1990 Induced spawning of Indian major carps through single application of Ovaprim-C. In: The Second Fisheries Forum. (Eds. Hirano, R. and Hanyu, I.) Asian Fisheries Society, Manila, Phillippines. 991 pp.
- Nandheesha MC, Bhadraswamy G, Patil JG, Varghese TJ, Sharma K, Keshavanath P. 1993. Preliminary results on induced spawning of pond-raised maser Tor khudree. J. Aqu. Trop. 8, 55-60

- Netch MF, Witt A. 1962. Contributions to life history of the longnosegar (*Lepisosteus osseus*) in Missyri. Missouri Wildlife Research Unit: U.S. Fish and Service. 251-262.
- Ng TB, Idler DR. 1983. Yolk Formation and Differentiation in Teleost Fishes. In: Fish Physiology IXA. Reproduction Part. A: Endocrine Tissues and Hormones. W.S. Hoar; D.J. Randall y E.M. Donaldson (Eds.). Accademic Press Inc., London. p. 373-404.
- Norberg B, Haux C. 1985. Induction, isolation and characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two Salmo species: Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). Comp. Biochem. Physiol., 81B (4): 869-876.
- Norberg B, Haux C. 1988. An Homologous Radioimmunoassay for Brown Trout (*Salmo trutta*) Vitellogenin. Fish Physiology and Biochemistry 5(2): 59-68.
- Nuñez-Rodriguez J, Kah, O, Geffard M, Le Menn, F. 1989. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Sole (*Solea vulgaris*) Vitellogenin. Comp. Biochem. Physiol. 92B(4): 741-746.
- Nuñez J, Bon E, Le Menn F. 1996. Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. The Journal of Experimental Zoology; 274: 163-170.
- Oosterhout C, Zijlstra WG, Heuven MK, Brakefield PM. 2000. Inbreeding depression and genetic load in laboratory metapopulations of the butterfly *Bicyclus anynana*. Evolution 54: 56-64.
- Opresko L, Wiley HS, Wallace R. 1981. Receptor-mediated binding and internalization of vitellogenin by *Xenopus* oocytes. J. Cell Biol., 91, 218a.
- Ouchterlony O. 1949. Antigen-Antibody Reactions in Gels. Acta Pathologica et Microbiologica. Scandinavica. 26: 507-515.
- Pandey AK, Patiyal RS, Upadhyay JC, Tyagi M, Mahanta PC. 1998. Induced spawning of the endangered golden mahseer, *Tor putitora*, with ovaprim at the state fish farm near Dehradun, Indian Journal of Fisheries 45(4): 457-459.
- Patiño R. 1997. Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. The progressive fish-culturist 59:118-128.
- Pelissero C, Bennetau B, Babin P, Le Men F, Dunogues J. 1991. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the siberian sturgeon *Acipenser baeri*. Journal Steroid Biochemical Molecular; 38: 293-299.
- Pérez 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.

- Perez-Sanchez E, Paramo S. 1998. Estudio histológico de las gónadas de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae). Universidad y Ciencia. 14(27): 69-82.
- Person-Le RJ. 1989. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. Advances in Tropical Aquaculture, Aquacop. IN FREMER Actes de Colloque 9, 625-642.
- Peter RE. 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.
- Powell F, Zohar Y, Elizaur A, Park M, Fischer H, Craig G, River E, Lovejoy A, Sherwood N. 1994. Three forms of gonadotropin - releasing hormone characterized from the brain of one species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91: 12081-12085.
- Redding MJ, Patiño R. 1993. Reproductive Physiology. In D. H. Evans (Editor). The Physiology of Fishes Chapter 16. CRC Press, Boca Ratón Florida.
- Reddy P, Renaud R, Leatherland JF. 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
- Resendez A, Salvadores ML. 1983. Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* Gunther, del Estado de Tabasco. Biotica 8(4): 413-426.
- Riazi A, Fremont L. 1988. Serum vitellogenin and yolk proteolipid complex composition in relation to ovarian growth in rainbow trout *Salmo gairdneri*, (RICH). Comparative Biochemical Physiology; 89B: 525-529.
- Rinchar J, Kestemont P, Heine R. 1997. Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. II. Sex steroid and plasma protein phosphorus concentrations. Journal of Fish Biology, 50: 169-180.
- Rodríguez G. 1992. Evaluación gonádica de parentales para la inducción a la reproducción. Temas actuales sobre reproducción de teleósteos; Rodríguez, M. (ed)., SEPESCA-UAM, México. 25-35 pp.
- Rodríguez J, Banda A, Gonzalez L, Herrera J, Garcia F. 1998. Evaluación biológico-pesquera del catán (*Atractosteus spatula*) en la presa Vicente Guerero. V Congreso Nacional de Ictiología, Tuxpan, Ver. pp182-183.

- Rodríguez NJ, Bon E, Le Menn F. 1996. Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Zool., 274: 163-170.
- Rosch R, Appelbaum S. 1985. Experiments on the suitability of dry food for larvae of *Coregonus lavaretus* L. Aquaculture, 48, 291- 302
- Schafhauser-Smith D, Benfey TJ. 2002. The purification and development of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of vitellogenin in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Fish Physiology and Biochemistry., 24(4): 287-298.
- Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. Aquaculture 197: 3-24.
- Sherwood N. 1987. Gonadotropin-releasing hormones in fish. In: Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles. Norris, D. and R. Jones (Eds.). Plenum Press, New York. 613.
- Sherwood N, Doroshov S, Lance V. 1991. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in bony fish that are phylogenetically ancient: Redfish (*Calamoichthys calabaricus*), sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and alligator gar (*Lepisosteus spatula*). Gen. Comp. Endocrinol. 84:44-57.
- Sherwood N, Eiden L, Brownstein M., Spiess J, Vale W. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2794-2798.
- Shimizu M, Fukada H, Fujita T, Hiramatsu N, Hara A. 2000. Serum Levels of Precursors to Vitelline Envelope Proteins (choriogenins) in Sakhalin Taimen after Treatment with Oestrogen and During Oocyte Growth. Journal of Fish Biology 57: 170-181.
- Sicard-González MT. 2007. Efecto de la oscilación térmica en la fisiología de la almeja mano de León (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835) Tesis de doctorado Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL 185pp
- Siebenaller JF. 1984. Analysis of the biochemical consequences of ontogenic vertical migration in a deep-living teleost fish Physiological Zoology 57, 598-608
- Silverstein T, Bosworth G, Wolter W. 1999. Evaluation of dual injection of LHRH and the dopamine receptor antagonist pimozide in cage spawning of channel catfish *Ictalurus punctatus*. J. World Aquacul. Soc., 30 (2): 263-268.
- Simon T, Wallus R, 1989. Contributions to the early life histories of gar (Actynopterygii: Lepisosteidae) in the Ohio and Tennessee river basins with emphasis on larval development. Trans. Ky. Acad. Sci. 50(1-2): 59-74.

- Sindermann CJ. 1988. Skeletal deformities in striped bass. In: Sindermann, C.J. and Lightner, D.V. (eds) Disease Diagnosis and control in North American Marine Aquaculture. Elsevier, Amsterdam, pp. 370-372
- Specker JL, Sulliang CV. 1994. Vitellogenesis in fish: status and perspectives. Perspectives in Comparative Endocrinology. 304-315.
- Specker J, Anderson TR. 1994. Developing an ELISA for a Model Protein–Vitellogenin. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 3. Chapter 48. Hochachka and Mommsen Eds. p. 567 – 578.
- Sumpter JP. 1982. The purification and radioimmunoassay of vitellogenin from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Abstract Pap.; International Symposium Comparative Endocrinology; 9: 11 pp.
- Susca V, Corriero A, Bridges CR, De Metrio G. 2001. Study of the Sexual Maturity of Female Bluefin Tuna: Purification and Partial Characterization of Vitellogenin and its use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of Fish Biology 58: 815-831.
- Suttkus RD. 1963. Order Lepisoste, in fishes of the Western North Atlantic. Mem. Sears. Foundation Mar. Res.; 1(3): 630 pp.
- Takemura A, Teruya K. 1997. Purification and partial characterization of the vitellogenin of coral trout *Plectropomus leopardus*. Bulletin of Marine Science 61 (3): 791-800.
- Takemura A, Oka M. 1998. Immunochemical sexing of living yellow tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin like protein. Aquaculture Research 29: 245-249.
- Tandler A, Kolkovski S. 1991. Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the successful use of microdiets in *Sparus aurata* larval rearing. European Aquaculture Society, Special Publication No. 15, Gent, Belgium. pp. 169-171.
- Taranger GL, Haux C, Stefansson SO, Bjornsson BT, Walther BT, Hansen T. 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.
- Tucker JW. 1994. Spawning by captive serranid fishes: a review. Journal of the World Aquaculture Society 25(3): 345-359.
- Tyler C, Sumpter JP, Bromage N. 1988. In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. The Journal of Experimental Zoology 246: 171-179.

- Tyler CR, Sumpter JP, Witthames PR. 1990. The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction* 43: 202-209.
- Tyler CR, Sumpter JP. 1990a. The Purification and Partial Characterization of Carp, *Cyprinus carpio*, Vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry* 8(2): 111-120.
- Tyler CR, Sumpter JP. 1990b. The Development of a Radioimmunoassay for Carp, *Cyprinus carpio*, Vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry* 8(2): 129-140.
- Tyler CR, Lancaster P. 1993. Isolation and characterization of the receptor for vitellogenin from follicles of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Comparative Physiology B.*; 163: 225-233.
- Tyler CR, Sumpter JP, Bromage NR. 1990. An in vitro culture system for studying vitellogenin uptake in to ovarian follicles of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *The Journal of Experimental Zoology*; 255: 216-231.
- Verreth JA, Carrillo M, Zanuay S, Huisman EA. 1987. Aquaculture research in Latin America. The Latin American seminar on Aquaculture, International Foundation for Science, Stockholm, Sweden, in Lima, Peru., 45-77.
- Verreth JA, Torreele E, Spazier E, Van Der Sluiszen A, Rombout JH, Booms R, Segner H. 1992. The development of a functional digestive system in the african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of the World Aquaculture Society*. 23 (4): 286-298.
- Waagboe R, Sandnes K. 1988. Determination of Vitellogenin in Serum of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) by High-Performance Gel Permeation Chromatography. *Journal of Chromatography* 427: 138-143.
- Wang SJ, Hard J, Utter F. 2001. Salmonid inbreeding: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Volume 11, Number 4 / December, 2001: 301-319
- Weber K, Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal Biol. Chem.*, 244:4406-4412.
- Weber GM, King W, Clark RW, Hodson RG, Sullivan CV. 2000. Morphophysiological predictors of ovulatory success in captive striped bass *Morone saxatilis*. *Aquaculture* 188:133-146.
- Wiley HS, Opresko L, Wallace R. 1979. New Methods for the Purification of Vertebrate Vitellogenin. *Analytical Biochemistry* (97): 145-152.
- Wolters W. 1993 Channel catfish breeding and selection program: constraints and future prospects. In: Main. K and Reynolds, E (eds) selective Breeding of

Fishes in the United States and Asia, The Oceanic Institute, Makakapuu point Hawaii, USA 267 pp

- Yao Z, Crim LW. 1996. A Biochemical Characterization of Vitellogenin Isolated from the 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.
- Zanuy S, Carrillo M. 1987. La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. *Reproducción en Acuicultura.*, 1-56.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical Analysis*. Third edition. Prentice Hall, New Jersey, U. S. A. 662 p.p.
- Zitzow RE, Millard JL. 1988. Survival and growth of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) larvae fed only formulated diets. *Aquaculture*, 69:105-113.
- 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