

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
LIPOVITELINA OVARICA DE EJEMPLARES
ADULTOS DE *Atractosteus spatula*

TESIS QUE PRESENTA

BIOL. VERONICA MELINNA CORTES DAVILA

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

CD. UNIVERSITARIA

JUNIO DEL 2003

TM

Z5320

FCB

2003

.C6



1020148945

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
LIPOVITELINA OVARICA DE EJEMPLARES
ADULTOS DE *Attractosteus spatula***

TESIS QUE PRESENTA

BIOL. VERONICA MELINNA CORTES DAVILA

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

CD. UNIVERSITARIA

JUNIO DEL 2003

973504

TH
25320
FEB
2003
.C4



FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA LIPOVITELINA
OVARICA DE EJEMPLARES ADULTOS DE *Atractosteus spatula***

TESIS QUE PRESENTA

BIOL. VERONICA MELINNA CORTES DAVILA

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

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



**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA LIPOVITELINA
OVARICA DE EJEMPLARES ADULTOS DE *Atractosteus spatula***

TESIS QUE PRESENTA

BIOL. VERONICA MELINNA CORTES DAVILA

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

COMITE


DR. ROBERTO E. MENDOZA ALFARO
DIRECTOR DE TESIS


DR. JESUS MONTEMAYOR LEAL
SECRETARIO


DR. CARLOS AGUILERA GONZALEZ
VOCAL

INDICE

INDICE	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
1. OVOGÉNESIS.....	4
1.1. Estructura del ovario.....	4
1.2. Crecimiento ovocitario	5
1.3. Vitelogénesis.....	7
1.4. Control Hormonal.....	11
2. CARACTERIZACION Y PURIFICACIÓN	14
2.1. Cromatografía de Exclusión Molecular.....	14
2.2. Cromatografía de Intercambio Iónico.....	14
2.3. Electroforesis.....	14
2.4. Precipitación de proteínas séricas.....	16
2.5. Cromatografía de afinidad (Proteína A)	16
2.6. Western-Blot.....	17
2.7. Inmunoprecipitación	17
IMPORTANCIA	18
ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
HIPÓTESIS	19
METODOLOGÍA	20
1. Obtención del material biológico	20
2. Obtención de muestras de gónadas	20
a) Extracción de gónadas	20
3. Purificación de la VTL.....	21
a) Preparación del extracto de ovario.....	21
b) Obtención del plasma.....	21
c) Precipitación	21
d) Filtración en gel	22

e)	Cromatografía de Intercambio Iónico.....	22
f)	Electroforesis	22
g)	Caracterización	23
h)	Producción de anticuerpos	25
i)	Purificación de anticuerpos (Proteína A).....	25
j)	Western Blott	26
k)	Sexado de organismos en campo	26
RESULTADOS		27
1.	Purificación de la VTL.....	27
a)	Precipitación	27
b)	Filtración en gel	27
c)	Intercambio de Iones.....	31
d)	Electroforesis	31
e)	Determinación del Peso molecular de la VTL.....	33
f)	Generación y Purificación de anticuerpos	34
g)	Sexado de organismos	35
DISCUSIÓN.....		39
	Purificación de la VTL	39
	Determinación del peso molecular de la VTL.....	41
	Sexado de los organismos de campo	42
CONCLUSIONES		46
LITERATURA CITADA.....		47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estimaciones del peso molecular, en diferentes peces	9
Tabla 2.	Composición porcentual de la VTG, en diferentes especies de peces.....	10
Tabla 3.	Técnicas utilizadas para la caracterización y purificación de la VTG.	15
Tabla 4.	Valores utilizados en el análisis de regresión lineal.....	33
Tabla 5.	Características morfométricas utilizadas para determinar el sexo de los reproductores.....	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama esquemático describiendo el control hormonal en la síntesis de la vitelogenina.	13
Figura 2.	Diseccción de hembras maduras de <i>Atractosteus spatula</i>	20
Figura 3.	Obteneción del plasma.....	21
Figura 4.	Gel de Poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes.....	27
Figura 5.	Fracciones proteicas (280 nm) del extracto de ovario maduro precipitado separado con Sephacryl-300.....	28
Figura 6.	Fracciones del extracto de ovario maduro precipitado separados con Sephacryl-300 positivas a la prueba de la 1'ortotoluidina (630 nm) para detectar la presencia de carbohidraos.....	28
Figura 7.	Fracciones del extracto de ovario maduro precipitado separados con Sephacryl-300 positivas a la prueba de Negro Sudan B (553 nm) para detectar la presencia de lípidos.....	29
Figura 8.	Barrido del extracto de ovario para detectar la presencia de carotenoides.....	29
Figura 9.	Fracciones proteicas (280 nm.) del extracto de ovario maduro precipitado separadas con Sepharosa-6B	30
Figura 10.	(1) Extracto de gónada de <i>A. tropicus</i> (2), Extracto de gónada de <i>A. spatula</i> , (3. 4. 5) Fracciones proteicas en Sepharosa-6B (6. 7. 8) Fracciones proteicas en Sephacryl-300, (9. 10) Fracciones proteicas en DEAE-Sephacel.....	31

Figura 11. Fracciones proteicas, resultantes de la separación por filtración en gel con Sephacryl-300, sometidas a Cromatografía de intercambio de iones (DEAE-Sephacel). Gradiente lineal de KCl 0.5 M en buffer Tris-HCl 50 mM, pH8, flujo de 1 ml/min.....	31
Figura 12. Determinación del peso molecular (miles de daltons) de la VTL, en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes.	32
Figura 13. (1) Filtración en gel, (2) Intercambio de iones, (3) Precipitado del extracto de ovario	33
Figura 14. Determinación del peso molecular de la VTL, mediante el análisis de regresión lineal del Kav y Log PM.....	34
Figura 15. Espectro de elusión de los IgG (fracciones 5 a 10) separados con Proteína A.	35
Figura 16. Sexado de <i>Atractosteus spatula</i> , mediante la técnica de pruebas cruzadas.....	36
Figura 17. Sexado de <i>Atractosteus spatula</i> , mediante la técnica de electroforesis.....	36
Figura 18. Valores promedio de peso (kg) de adultos de <i>Atractosteus spatula</i>	37
Figura 19. Valores promedio de longitud (cm) de adultos de <i>Atractosteus spatula</i> maduro, precipitado a 280 nm, en Sephacryl-300	37

RESUMEN

El catán (*Atractosteus spatula*) es la especie dulceacuícola de mayor tamaño que habita en las aguas continentales de México, posee un valor económico, científico y faunístico particular. Actualmente esta especie tiende a desaparecer, debido al gran impacto comercial que han venido sufriendo las poblaciones, despertando por el interés como producto alimenticio, así como de la pesca deportiva. Esto implica necesariamente abordar un problema desde el punto de vista 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. Hasta el momento, no se ha ejercido control alguno sobre su reproducción lo que ha originado que su temporada de reproducción y desove se restrinja a solo una semana del año, lo cual ha venido evidentemente limitando la producción de crías necesarias para restaurar los niveles poblacionales de la especie. La solución inmediata 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. El objetivo central de este estudio es el aislamiento y purificación de una molécula exclusivamente femenina, tal como la lipovitelina ovárica (VTL) para el posterior establecimiento de un inmunoensayo que será empleado para cuantificar los niveles de esta molécula. Esto se logró mediante un protocolo inicial consistente en una precipitación con una solución de EDTA-MgCl₂, seguida de una cromatografía de filtración molecular utilizando como soporte Sephacryl-300-HR, y posteriormente separando las moléculas mediante cromatografía de intercambio de iones con DEAE-Sephacel. Para verificar que las fracciones proteicas obtenidas correspondían a las moléculas buscadas, se llevaron a cabo pruebas cruzadas, utilizando anticuerpos anti-Vitelogenina de *Atractosteus tropicus*. Estos resultados permitieron realizar el sexado de 39 organismos adultos, de los cuales 25 resultaron machos y 14 hembras. La purificación y caracterización de la VTL se confirmó mediante el peso molecular determinado por cromatografía de filtración en gel (315,500 Da) y SDS-PAGE (316.85 Da). Igualmente, se corroboró la autenticidad de esta molécula en base a sus grupos prostéticos (carbohidratos y lípidos). De este estudio se deriva la importancia de la lipovitelina ovárica de *A. spatula* como marcador bioquímico para estimar el grado de madurez sexual, así como el sexo de ejemplares adultos.

INTRODUCCIÓN

El catán (*Atractosteus spatula*), es un pez nativo de Norteamérica que se encuentra distribuido tanto en los Estados Unidos como en México. En nuestro país, se localiza en los estados de San Luis Potosí, Veracruz y Tamaulipas (Morales, 1987) y su distribución se extiende hacia el Norte, a todo lo largo de la costa del Golfo de México hasta Florida, igualmente se le encuentra en el Valle del Mississippi y en las partes bajas de los ríos Ohio y Missouri. También, se ha reportado su eventual presencia en Sudamérica, particularmente en Nicaragua y en el Noroeste de Costa Rica (Mendoza, *et al.*, 2000a).

Esta especie ha sido a menudo asignada al género *Lepisosteus*, que constituyen un grupo de peces muy particular, ya que la prevalencia de varias de sus características primitivas los separa del resto de los teleósteos (Mendoza, *et al.*, 2000b). Estos organismos poseen un gran valor científico puesto que son sobrevivientes de un grupo ancestral que floreció durante el Triásico, antes que la mayoría de los peces modernos y tienen un valor faunístico especial no solo por tratarse de una especie endémica, si no por la situación actual de sus poblaciones que tienden a desaparecer. *A. spatula* ocupa el último eslabón de la cadena alimenticia, siendo una especie ictiófaga, y alcanza el mayor tamaño dentro de este grupo (2 mts.) (Morales, 1987).

Esta especie habita en cuerpos de agua dulce como ríos, arroyos, presas y lagunas, preferentemente donde existe abundante vegetación acuática sumergida. Pueden tolerar aguas con nubes planctónicas y turbidez moderada o temporal. Es resistente a la salinidad y no es raro encontrarlo en aguas salobres e inclusive saladas. En verano es frecuente encontrarlo en la superficie del agua y en invierno se localiza en el fondo.

El catán tiene una importancia considerable como alimento en la zona noreste de México, por la calidad de su carne, por su tamaño y facilidad para ser fileteado. Igualmente, es apreciado a nivel artesanal, ya que los indígenas del norte y Centroamérica han venido utilizando las escamas y los huesos para construir instrumentos rituales y ornamentales, así como artículos de joyería.

Por otra parte, estos peces también han sido sujetos a una intensa pesca deportiva ya que su tamaño los convierte en un atractivo trofeo. Desafortunadamente, las poblaciones

naturales se han visto afectadas al no existir normas que regulen su captura, lo cual se ha traducido en una drástica disminución de sus poblaciones. A esto se pueden añadir, las evidentes alteraciones que han venido sufriendo los ecosistemas acuáticos en que habitan, producto de la contaminación, la reducción de los volúmenes de agua, al ser esta desviada hacia las ciudades por la construcción de presas y canales, representando factores que de manera definitiva afectan las poblaciones del catán. Lo anterior se ha visto claramente reflejado en los registros estadísticos de pesca de la década pasada en el Estado de Tamaulipas. Así, mientras que en 1988 se capturaban 13.2 toneladas, este volumen se redujo a 5.7 toneladas en 1990 y para 1997 solo se lograron obtener 1.1 toneladas (estadística pesquera CRIP-Tampico).

A nivel nacional únicamente se cuenta con 40 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. Considerando la importante reducción del número de individuos en el ambiente natural, resulta imperativo el desarrollo de técnicas dirigidas hacia el control de la reproducción en cautiverio, como una medida inmediata para incrementar la disponibilidad de larvas 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.

Para inducir la vitelogénesis y la maduración ovocitaria normalmente se recurre a 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, se requiere de una infraestructura especial y a menudo costosa para regular la luz diaria y la temperatura, así como de una alimentación particular. En el otro extremo, 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 en la producción de crías y la

flexibilidad en la programación de la producción de larvas sin necesidad de emprender modificaciones ambientales onerosas.

Por otra parte, el control de la reproducción en el caso de los lepisosteidos se complica ya que la evaluación de las inducciones hormonales resulta difícilmente realizable de la manera en que se lleva a cabo en otros peces, por canulación. En efecto, estos animales presentan una condición ginoaria, por lo cual no es posible obtener muestras de ovocitos directamente para evaluar su etapa de maduración.

Otro aspecto esencial dentro de la estrategia de manejo reproductivo de las especies es la constitución adecuada de lotes de reproductores, para lo cual resulta indispensable el sexado precoz de los animales. En el caso de los lepisosteidos esto solo es posible después de varios años y únicamente en algunas especies en las que se presenta dimorfismo en ciertas estructuras. De aquí, que se hayan propuesto como alternativa modelos alométricos para diferenciarlos (Chavez Lomeli, 1989). En el mismo sentido, recientemente se han implementado métodos basados en la diferenciación de los gonoductos de hembras y machos, los cuales a pesar de resultar eficaces implican el sacrificio de los animales (Ferrara, A. y Irwin, E., 1999)

Considerando este contexto, una alternativa práctica para facilitar el sexado de los organismos y estimar su grado de madurez, como respuesta a las inducciones hormonales, se encuentra en el aislamiento y purificación de la Lipovitelina ovárica, así como en la implementación de un inmunoensayo para cuantificar los niveles de éstas moléculas. Esta aproximación 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.

ANTECEDENTES

1. OVOGÉNESIS

1.1. Estructura del ovario

La complejidad estructural y funcional de la gónada femenina puede variar desde un simple saco a un órgano complejo que produce ovocitos y almacena esperma, para la posterior fertilización de los óvulos (Verreth, *et al.*, 1987; Zanuy y Carrillo, 1987), e incluso para la alimentación y desarrollo del embrión como en el caso de las células trofoténicas de la mayoría de los peces (Mendoza, 1994).

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 del mismo 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 se encuentran las ovogonias, inmersas en la pared conjuntiva de los repliegues peritoneales, formando el estroma ovárico, el cual contiene vasos sanguíneos y células somáticas (las foliculares y tecales) involucradas en el desarrollo del ovocito.

Las ovogonias están destinadas a convertirse en ovocitos a lo largo de la vida productiva de la hembra. (Zanuy y Carrillo, 1987; Benítez, 1992). 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).

El folículo ovárico está formado por dos capas: *la granulosa*, que se forma a medida que se incrementan las células foliculares y se produce el crecimiento del ovocito, y *la teca* o envoltura folicular externa, la cual se origina a partir de la organización del tejido

conectivo del estroma. Ambas capas están separadas por una membrana basal (Barr, 1968; Pérez y Páramo, 1998).

Se han detectado actividades esteroideogénicas en las capas mencionadas anteriormente. Así, se ha demostrado que el ovario puede sintetizar corticosteroides, progestágenos importantes para la maduración de los ovocitos ($17\alpha20\beta$ -diOHP), andrógenos (precursores de los estrógenos trans aromatización) y estrógenos esenciales para la vitelogénesis (17β -estradiol) (Verreth, *et al.*, 1987; Mommsen and Walsh, 1988).

Las fases más características por las cuales pasa el ovario funcional son las mitosis ovogoniales, la transformación de ovogonias en ovocitos primarios, la vitelogénesis, la maduración y la ovulación (Verreth, *et al.*, 1987).

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 amarillo-rosa, 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.

1.2. Crecimiento ovocitario

El desarrollo folicular, puede llevarse a cabo por diferentes modalidades, aunque hasta ahora se reconocen 4 patrones de desarrollo principales. 1) El patrón sincrónico, proceso que ocurre cuando todos los ovocitos inician de manera simultánea su crecimiento en todas las regiones del ovario, siendo este fenómeno típico de especies que se

caracterizan por tener temporadas reproductivas cortas y un solo desove al año, e.g. ciclóstomos y salmónidos (Rodríguez, 1992; Pérez & Páramo, 1998). 2) El desarrollo sincrónico por grupos, el cual se presenta en especies que se reproducen más de una vez en su vida (iteroparos). En este caso se identifican al menos dos poblaciones de ovocitos en algún momento durante su ciclo ovárico, reconociéndose dos estadios diferentes de maduración: uno con ovocitos maduros listos para ser expulsados y un segundo grupo de ovocitos inmaduros (reserva). Los ovocitos primarios no evolucionan hasta que se terminan de desarrollar los ovocitos, secundarios. Este patrón de desarrollo es típico de especies que desovan una vez al año (trucha, lenguados, bagre d la India). 3) El patrón más o menos sincrónico por grupos. En este caso la maduración y ovulación ocurre en grupos (solo una fracción de los ovocitos madura al mismo tiempo) lo que genera varios desoves en un mismo ciclo. Se presenta en varias especies marinas que producen un gran número de huevos pelágicos. 4) Desarrollo asincrónico. En este patrón se presentan continuamente todas las etapas ovocíticas en un mismo ovario, lo que implica la existencia de ovocitos en varios estados de desarrollo, esto trae como consecuencia ovulaciones y desove repetidos. Se presenta en especies como la tilapia, carpa, sardina, trucha moteada, etc.

En cualquiera de los casos dicho desarrollo folicular puede quedar interrumpido en cualquiera de las fases de crecimiento del ovocito (previtelogénesis o de vitelogénesis); debido a que el óvulo es susceptible de presentar un proceso denominado atresia, durante el cual el folículo presenta cambios degenerativos que conducen a la licuefacción y finalmente reabsorción del vitelo. Esta condición es común en los folículos vitelínicos aunque, bajo ciertas condiciones, también puede ocurrir en los previtelogénicos (Benítez, 1992).

El crecimiento de los ovocitos comienza con un incremento en la talla del núcleo (núcleolos perinucleares - distribución de los nucleolos en la periferia del núcleo-), y al mismo tiempo se observa una importante acumulación del RNA en el citoplasma, coincidiendo con los procesos meióticos. Posteriormente, se da el proceso de vitelogénesis siendo este una secuencia de procesos complejos, pero coordinados, implicados en la formación de vitelo y su acumulación. Por último, se presenta una fase madurativa, la cual está caracterizada por la clarificación del vitelo, la migración del núcleo a la periferia, así como por la hidratación del ovocito (Verreth, *et al.*; 1987). Este proceso es variable en términos de tiempo y puede durar desde algunos días, hasta varios años, según la especie.

1.3. Vitelogénesis

Los meses anteriores al desove se caracterizan por un importante crecimiento del ovario. Este crecimiento es producto de la acumulación de grandes cantidades de reservas nutritivas o vitelo, por parte de los ovocitos. La síntesis de vitelo y su incorporación dentro de los ovocitos recibe el nombre de vitelogénesis, siendo este 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 RER en la granulosa y la teca, el aparato de Golgi se observa mucho más extenso con inclusiones electro-densas, en el citoplasma se dispersan 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 ovulación y la expulsión del primer glóbulo polar se produce de manera simultánea con la fertilización.

1.3.1. 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; Rodríguez *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 es incorporada la VTG en el interior del ovocito se lleva a cabo el clivaje proteolípido dando como resultado lipovitelinas y fosfovitelinas (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) (Figura 1).

Los receptores de la VTG ya existen desde que los ovocitos están en previtelogenesis, 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.

1.3.2. 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 1.

Tabla 1. 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 & Haux	1985
<i>Cynoscion nebulosus</i>	200	Cromatografía en filtración en gel	Copeland & Thomas	1988
<i>Cyprinus carpio</i>	390	Cromatografía en filtración en gel e Intercambio de iones	Tyler & 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 & Sawano	1995
<i>Oreochromis mossambicus</i>	130 200	Cromatografía de Intercambio de iones SDS-PAGE	Johanning & Specker	1995
<i>Acanthopagrus shlegeli</i>	636 321	Cromatografía en filtración en gel, Electroforesis	Chang, <i>et al.</i> ,	1996
<i>Macrozoarces</i>	577.8	Cromatografía en	Yao & Crim	1996

<i>americanus</i>		filtración en gel		
<i>Cydopterus limpus</i>	630.5	Cromatografía en filtración en gel	Yao & Crim	1996
<i>Gadus morhua</i>	485.2	Cromatografía en filtración en gel	Yao & Crim	1996
<i>Plectropomus leopardus</i>	350	Cromatografía de filtración en gel	Takemura & 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, está compuesto principalmente de fosfolípidos (Mommsen and Idler, 1983), contribuyendo de esta manera al transporte y translocación de la molécula en el sistema circulatorio. Así mismo, esta molécula está 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 2), y de la etapa de vitelogenénesis 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 2. Composición porcentual de la VTG, en diferentes especies de peces

	PROTEÍNA %	LÍPIDOS %	FÓSFORO %	CARBOHIDRATOS %
<i>Anguilla japonica</i> Komatsu, <i>et al.</i> , 1996	86.0	13.0	---	1.0
<i>Macrozoarces</i> <i>americanus</i> Yao & Crim, 1,996	---	18.0	3.6	---
<i>Cydopterus</i> <i>limpus</i> Yao & Crim 1,996	---	21.18	2.45	---
<i>Gadus morhua</i>				

Yao & Crim, 1996	----	21.34	2.15	----
<i>Cyprinus carpio</i> Linhart <i>et al.</i> , 1995	17.6 - 27.7	2.2 - 7.3	----	----
<i>Oreochromis mossambicus</i> Specker & Sullivan, 1994	0.1	----	1.7	----

1.4. Control Hormonal

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 el eslabón más directamente implicado en la reproducción de hembras durante la vitelogénesis, maduración, ovulación y secreción de esteroides (Zanuy y Carrillo, 1987; Nagahama, *et al.*, 1993; Silverstein, *et al.*, 1999).

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 and Idler, 1983; Peter, 1983; Lam, 1985; Zanuy y Carrillo, 1987; Sherwood, 1987).

Actualmente, se ha aceptado la existencia de dos gonadotropinas hipofisiarias con distintas funciones (Peter, 1993; Powell, *et al.*, 1993). Así se ha definido la acción de una GtH madurativa y otra GtH vitelogénica (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).

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), inhiben a nivel de la pituitaria, bloqueando la liberación espontánea de las gonadotropinas (Peter, 1983). 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 (17 α -20 α dihidroxiprogesterona) (Maturative Inducing Steroid -MIS-) el cual induce la maduración ovocitaria y sus eventos asociados (Nagahama, 1987).

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) (Figura 1).

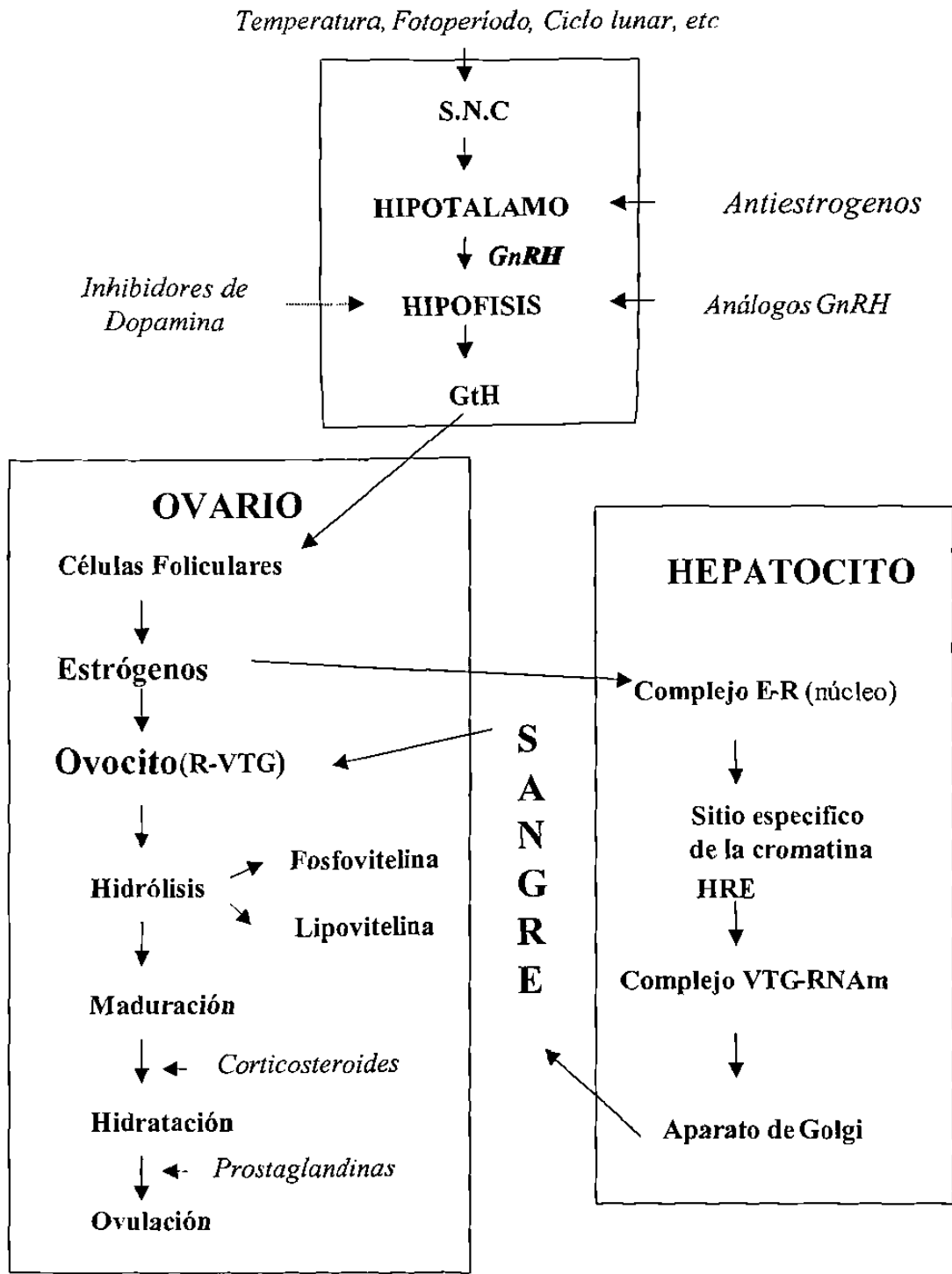


Figura 1. Diagrama esquemático describiendo el control hormonal en la síntesis de la vitelogenina.

2. CARACTERIZACION Y PURIFICACIÓN

Diversas técnicas de cromatografía y electroforesis se han empleado de manera frecuente para aislar y separar moléculas, estimar su peso molecular y distinguir diferentes aspectos de su estructura. Así, en estudios recientes se han purificado y caracterizado tanto la VTG plasmática como la VTL 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 3).

2.1. Cromatografía de Exclusión Molecular

La separación por cromatografía se basa en las fuerzas competitivas de dos fases, una fija o estacionaria que consta de diminutas partículas esféricas de gel que funcionan como cribas moleculares; y otra continuamente renovada o móvil, que se establece por las moléculas de un soluto. El fundamento para la filtración en gel se basa en la mayor o menor posibilidad de penetración de las moléculas en los poros de las partículas de relleno. Según su tamaño, se introducirán en los poros; cuanto menores sean, más profundamente entrarán y más tarde eluirán de la columna. permitiendo así la separación de moléculas de acuerdo a su masa molecular (Pharmacia Biotech, 1999).

2.2. Cromatografía de Intercambio Iónico

Esta técnica permite separar aquellas proteínas con un rango de peso molecular similar, en función de su carga iónica. El principio de esta técnica, reposa sobre la interacción que existe entre las moléculas de soluto cargadas eléctricamente y su contraparte (con carga opuesta) ligadas covalentemente a una matriz cromatográfica (Pharmacia Biotech, 1999).

2.3. Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), es un método analítico, de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida, constituyendo una poderosa herramienta para efectuar separaciones, aislamientos, evaluaciones de pureza y cuantificaciones del peso molecular.

<i>Mycteroperca microlepis</i>	Cromatografía de Intercambio iónico	Purificación y Caracterización de la VTG	Heppell & Sullivan	1999
<i>Salvelinus alpinus</i>	Precipitación y Cromatografía de Intercambio iónico	Purificación de la VTG	Johsen, <i>et al.</i> ,	1999
<i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Gobio gobio</i> <i>Leuciscus cephalus</i>	Cromatografía de filtración en gel e Intercambio iónico Electroforesis	Purificación y Caracterización de la VTG	Brion, <i>et al.</i> ,	2000
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Cromatografía de filtración en gel e Intercambio iónico	Purificación de la VTG	Schafhauser-Smith, <i>et al.</i> ,	2002
<i>Oryzias latipes</i>	Cromatografía de Intercambio iónico	Purificación de la VTG	Nishi Kazuto, <i>et al.</i> ,	2002

Otras técnicas comúnmente empleadas en la purificación de anticuerpos destinados a la caracterización o cuantificación de estas moléculas son las siguientes

2.4. Precipitación de proteínas séricas

Este método esta basado en la propiedad que tienen las proteínas para precipitar cuando la fuerza iónica del medio aumenta por el incremento en la concentración de sales. Este efecto se traduce en la deshidratación de los grupos hidrofílicos de las proteínas lo que trae como consecuencia una disminución de su solubilidad (Ternynck and Avrameas, 1986).

2.5. Cromatografía de afinidad (Proteína A)

La proteína A es un polipéptido de 42,000 Daltons constituyente habitual de la pared celular de *Staphylococcus aureus*. Esta proteína presenta una fuerte interacción con los anticuerpos: la proteína A tiene cuatro lugares potenciales de unión a los anticuerpos, pero sólo se puede usar uno a la vez. Sin embargo, la proteína A es claramente bifuncional permitiendo la formación de complejos multiméricos. En los anticuerpos la región de unión a la proteína A se encuentra en las regiones constantes segunda y tercera de la cadena pesada (Fc). Por ello, cualquier anticuerpo tiene al menos dos lugares de unión a la proteína A, y esto es una organización ideal para la formación de complejos multiméricos.

Por otra parte, la proteína A presenta diferentes propiedades que la hacen muy útil para la purificación de anticuerpos y en los estudios inmunocitoquímicos:

- Debido a que la región de unión con el anticuerpo reside en la región Fc, la unión a proteína A no cambia la capacidad del anticuerpo de unirse a su antígeno.

- Incluso una proteína A desnaturalizada se renaturaliza fácil y rápidamente recuperando su capacidad de unión.
- Aunque la afinidad de la proteína A por el anticuerpo es elevada, la unión antígeno-anticuerpo se puede romper con facilidad reduciendo el pH. Esta propiedad se ha aprovechado para el establecimiento de técnicas de cromatografía de afinidad en las cuales la fase sólida de la proteína A inmovilizada tiene una considerable utilidad para la purificación y caracterización de anticuerpos policlonales y monoclonales de un amplio rango de especies. Logrando así separar subclases de anticuerpos simplemente generando un gradiente lineal de pH. Esto representa una excelente alternativa para los métodos de precipitación y purificación de intercambio de iones.

2.6. Western-Blot

La técnica de Western Blot es aplicada comúnmente para la identificación específica de proteínas en una mezcla compleja. Esta técnica permite la identificación de las proteínas y péptidos, separados previamente por PAGE en base a la detección de antígenos presentes en la mezcla de moléculas mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra estas (Henderson and Wolf, 1992). Esto involucra la transferencia de los péptidos separados electroforéticamente a una matriz *inmóvil*, que generalmente es una membrana de nitrocelulosa o de nylon, con lo que se obtiene una replica del perfil de separación de polipéptidos del gel de electroforesis. Con la ventaja de que la membrana es más fácilmente manejable que el gel original y que los polipéptidos inmovilizados en la membrana son más accesibles a la reacción con anticuerpos.

2.7. Inmunoprecipitación

La reacción específica entre un antígeno y su anticuerpo correspondiente, y en particular la adición de cantidades crecientes del antígeno para reaccionar con una cantidad fija de anticuerpo produce complejos Antígeno-Anticuerpo (AG-AC) que van creciendo en tamaño hasta formar un precipitado en el punto de equivalencia. La reacción de precipitación se puede llevar a cabo en soluciones libres o en geles de azarosa en donde los complejos (AG-AC) pueden observarse como precipitados opacos (Lizana, 1989).

IMPORTANCIA

El catán (*Atractosteus spatula*), ha sufrido en los últimos años un gran impacto poblacional, como consecuencia de la presión pesquera comercial y deportiva, al grado que existe el riesgo de que la especie se extinga. de aquí, se deriva la necesidad de implementar técnicas que puedan ser utilizadas para el control de su reproducción, con la finalidad de obtener las crías necesarias para su repoblación, cuya producción está actualmente limitada a una época restringida del año.

ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN

Son muy escasas las investigaciones, que se han realizado en torno al ciclo de vida del catán (*Atractosteus spatula*), y en particular sobre su reproducción. Hasta el momento, los trabajos que se han realizado en relación al proceso reproductivo de esta especie han sido incipientes y se han limitado únicamente al mantenimiento de adultos en cautiverio, razón por la cual la obtención de crías se ha venido restringiendo a una sola semana en el año, lo cual representa evidentemente 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 esta regida por el sistema endocrino, la manipulación hormonal representa la vía más directa para el desarrollo de una reserva de crías. Este contexto conduce naturalmente a la necesidad de conocer las bases fisiológicas de la reproducción. Como una primera aproximación para este propósito, el aislamiento y purificación de la lipovitelina ovárica, así como la implementación posterior de un inmunoensayo para cuantificar los niveles de esta molécula constituye una herramienta esencial para responder a esta necesidad. En efecto, esto permitiría contar no solo con un índice bioquímico rápido y no invasivo para evaluar las inducciones hormonales, sino también con un método de sexado preciso que resultaría útil para la preparación de lotes de reproductores.

OBJETIVO GENERAL

Purificación de la lipovitelina ovárica como base para la realización de un inmunoensayo para la evaluación de la madurez gonádica y el sexado de ejemplares adultos de *Atractosteus spatula*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificación y caracterización de la lipovitelina ovárica.
2. Generación y purificación de anticuerpos policlonales, dirigidos contra esta molécula.
3. Identificación del género de catanes adultos mantenidos en cautiverio

HIPÓTESIS

El aislamiento, purificación y caracterización de la lipovitelina ovárica, permitirá utilizar esta molécula como marcador bioquímico para identificar el sexo y de ejemplares adultos de catán.

METODOLOGÍA

1. Obtención del material biológico

Se logró obtener una hembra adulta durante la temporada reproductiva, gracias a una donación por parte de la SAGARPA, del lote de reproductores mantenido en las instalaciones del “*Centro Acuicola Tancol*”, ubicado en el poblado de Tancol, en Tampico, Tamaulipas

2. Obtención de muestras de gónadas

a) Extracción de gónadas

La hembra fue disectada después de haber registrado su peso y talla (Fig. 2). Los ovarios obtenidos se fraccionaron y se mantuvieron en congelación a -30°C , para ser posteriormente utilizados en la purificación de la Vitelina



Figura 2. Disección de hembras maduras de *Atractosteus spatula*.

3. Purificación de la VTL

a) Preparación del extracto de ovario

Las 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.

b) Obtención del plasma

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante una punción caudal, con la ayuda de un vacutainer (Fig 3). Estas fueron colectadas 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 utilizadas para llevar a cabo el Sexado de los organismos

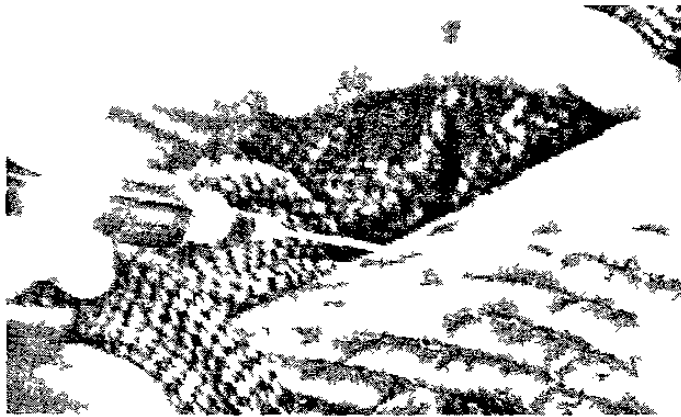


Figura 3. Obtención del plasma

c) Precipitación

Siguiendo la técnica de Wiley *et al.*, (1979), al extracto de gónada (4 ml) se le agregó una solución de EDTA 20mM, pH 7.7 (20 ml). Posteriormente, se adicionó MgCl₂ 0.5M (1.6 ml), y se mezclaron por inversión. El precipitado resultante se centrifugó a 4,500 r.p.m durante 30 min. El sobrenadante fue desechado, y el pellet fue rediseuelto con un buffer TRIS-HCl 50mM, NaCl 1M pH 7.5, y posteriormente fue centrifugado a 4,500 r.p.m durante 30 min. El sobrenadante fue mezclado con 25 ml de agua destilada y

posteriormente centrifugado a 4,500 r.p.m durante 30 min., conservando el precipitado con 3 ml de buffer TRIS-HCl 50mM, NaCl 1M pH 7.5.

d) Filtración en gel

Para la filtración en gel e intercambio de iones se utilizó un cromatógrafo modelo Gradi Frac (PHARMACIA BIOTECH). En el caso de la filtración en gel, las muestras fueron inyectadas en una columna (XK/26) de 64 cm de altura con 342,44 ml. de SEPHACRYL-300 HR (PHARMACIA BIOTECH), a un flujo de 1 ml/min. (Mendoza, *et al.*, 1993). De la misma manera, estas muestras fueron inyectadas a la misma velocidad de flujo en una columna (XK/26) de 58 cm de altura con 307.93 ml de Sepharosa-6B (PHARMACIA BIOTECH).

La columna se empacó con un buffer TRIS-HCl 0.02M, NaCl 2%, NaN_3 0.1%, iniciando con un flujo de 4 ml/min. durante 2 h, para posteriormente incrementarlo a 6 ml/min. durante 1h. (Fujita *et al.*, 1998). Para la calibración de la columna se utilizaron las siguientes moléculas de referencia: anhidrasa carbónica (29,000 Da), albúmina (66,000 Da), 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). El eluyente se monitoreo a 280 nm.

e) Cromatografía de Intercambio Iónico

Las fracciones colectadas después de la cromatografía de exclusión molecular fueron inyectadas en una columna XK/26 de 16 cm de altura conteniendo DEAE-Sepharcel (PHARMACIA BIOTECH) como soporte. La columna fue equilibrada con buffer TRIS HCl 50 mM pH 8, a un flujo de 1ml/min. (Mendoza, 1992). Para la elución de las moléculas retenidas se utilizó un gradiente lineal de 0 - 100 % de KCl (0.5M).

f) Electroforesis

Para la caracterización de las moléculas obtenidas mediante las técnicas de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico se realizaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes, utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8%, a una temperatura de cámara de 4°C, con un voltaje de 100v y una intensidad de 30 mA.

g) Caracterización

Las fracciones de los picos proteicos obtenidos de la filtración en gel e intercambio iónico fueron sometidas a las siguientes determinaciones:

Determinación de Proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante de la técnica descrita por Bradford (1976). Las muestras fueron leídas a 595 nm en un espectrofotómetro (SPECTRONIC GÉNESIS 2). Se utilizó BSA como proteína de referencia a partir de una solución de 1 mg/ml.

Determinación de Lípidos

Los lípidos se determinaron por medio de la técnica de Negro Sudan B, la cual consiste en incubar 250 µl. de muestra, con 250 µl de Negro Sudan en tubos eppendorf a 37 °C durante 20 h en oscuridad. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 r.p.m., durante 15 min. (Allen & Budowle, 1994).

Determinación de carotenoides

Para determinar la presencia de carotenoides se realizó un barrido del extracto de ovario en el espectrofotómetro (SPECTRONIC GÉNESIS 2) a longitudes de onda entre 260 y 700 nm, para seleccionar la longitud de onda y posteriormente, utilizar esta longitud de onda para identificar las fracciones con carotenoides obtenidas en las diferentes muestras obtenidas por cromatografía.

Determinación de Fósforo

La determinación de fósforo se realizó mediante la modificación del método de Fiske-Subbarow (1929), el cual consiste en mezclar 500 µl de muestra, con 1000 µl de buffer TRIS-HCl (pH8), 500 µl de ácido molibdenico, 500 µl del reactivo reducido (NaHSO₃ + p-metilaminofenol) y 2500 µl de agua. La solución se mezcló completamente y se mantuvo en reposo durante 20 min. Posteriormente, se registró la absorbancia a 750 nm. y se determinó la concentración de fósforo a partir de una curva estándar con KH₂PO₄.

Determinación de carbohidratos

Mediante la técnica de la l'ortotoluidina, se detectó la presencia de carbohidratos. Esta técnica consiste en aplicar 5000 µl de ortotoluidina y 1000 µl de muestra, las cuales posteriormente se mantienen en baño maría durante 10 min, para finalmente leer la absorbancia a 630 nm. (Dubowski, 1962).

Determinación del peso molecular

Para la determinación del peso molecular de la VTL, mediante la filtración en gel se realizo un análisis de regresión lineal considerando el parámetro de elución Kav, y el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar.

$$X = \frac{Y - A}{B}$$

Donde X: Antilogaritmo del peso molecular

Y: Kav

A: Ordenada al origen

B: Pendiente

Donde V_0 : Volumen muerto

V_e : Volumen de elusión de la molécula

V_t : Volumen total de la columna

La estimación del peso molecular fue corroborada mediante electroforesis. Para este propósito, se utilizó un kit de peso molecular con una mezcla de monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros de Hemocianina (MW-SDS-280.000 Da, SIGMA). Así, se llevó acabo un análisis de regresión lineal considerando el parámetro R_f , y el logaritmo del peso molecular de las proteínas de referencia.

$$R_f = \frac{\text{Distancia de la migración de la Proteína}}{\text{Distancia de la migración del frente}}$$

h) Producción de anticuerpos

Se generaron anticuerpos anti-VTL en conejos adultos de raza Nueva Zelanda. Los animales se inyectaron una primera vez por vía intravenosa con 200µg de VTL purificada, diluida en 200 µL de suero fisiológico (0.9% NaCl), lo que corresponde normalmente a una dosis adecuada para una respuesta rápida (Bolton and Hunter, 1986; Hunt and Chntler, 1980). Al cabo de 8 semanas, cuando la afinidad es máxima (Vaitukatis, 1981), se efectuó un refuerzo con la mitad de la dosis por la misma vía.

Se tomaron muestras de sangre a nivel de la vena marginal de la oreja cada dos semanas para seguir la evolución del título de los anticuerpos por doble difusión de acuerdo al método de Ouchterlony and Nilsson (1986). Esto permitió seleccionar a los animales que mostraban un título elevado, mismos que fueron sacrificados y cuya sangre fue extraída por punción intracardiaca dos semanas después del último refuerzo. La sangre completa (80 a 100 mL por conejo) fue puesta a coagular durante 12 hrs a 4°C y el suero (50 mL) fue enseguida separado por centrifugación a 10,000 g durante 30 min, como lo sugieren Johnston and Torpe, (1987)

i) Purificación de anticuerpos (Proteína A)

Se llevó a cabo inicialmente la precipitación de proteínas séricas agregando sulfato de amonio hasta el 40% de saturación (Ternynck and Avrameas, 1986).

A continuación, se preparó una columna de 10 mL con Proteína A, la cual fue inicialmente lavada con un buffer PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 M KH₂PO₄, 8.1mM Na₂HPO₄). En seguida, se pre-eluyó con el buffer de disociación (0.1 M glicina-HCl, pH2.5).

La muestra se aplicó a la columna y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

Se eluyó con PBS todo el material que no correspondía a los IgG, para lo cual se monitoreó el eluyente a A_{280} , como indicador de proteína. Cuando la A_{280} alcanzó el valor más bajo, se procedió a romper la interacción Proteína A-IgG con el buffer de disociación. Se monitoreó el eluyente a A_{280} y se colectaron los picos proteicos en tubos conteniendo 1M

Tris, pH 8.8, 120 μ L/fracción de 1mL. La columna se lavó con PBS hasta que el eluyente alcanzó un pH de 7.4.

Los IgG resultantes fueron pasados a través de una columna PD-10 con PBS para remover residuos de glicina y Tris.

j) Western Blott

Posteriormente a la separación de péptidos por SDS-PAGE se constituyó la unidad de transferencia utilizando como soporte inerte una hoja de nitrocelulosa (BA 85, Schleicher & Schuell). La migración se efectuó con un buffer de transferencia (Tris-HCl pH 8, 25mM, Glicina 150 mM, Triton X-100 1%) a 50mA (0.8 – 1mA/cm²) durante una hora.

k) Sexado de organismos en campo

El Sexado de los organismos se realizó mediante electroforesis y pruebas cruzadas, utilizando un anticuerpo anti-VTG realizado con vitelogenina purificada de *Atractosteus tropicus*. Para esta última prueba se prepararon 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 80°C para después 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

1. Purificación de la VTL

a) Precipitación

La adopción de un paso de pre-purificación por medio de precipitación selectiva ($MgCl_2$ -EDTA) resultó útil como se puede apreciar en la Fig.4, ya que se logró eliminar una importante cantidad de proteínas del extracto de ovario crudo.

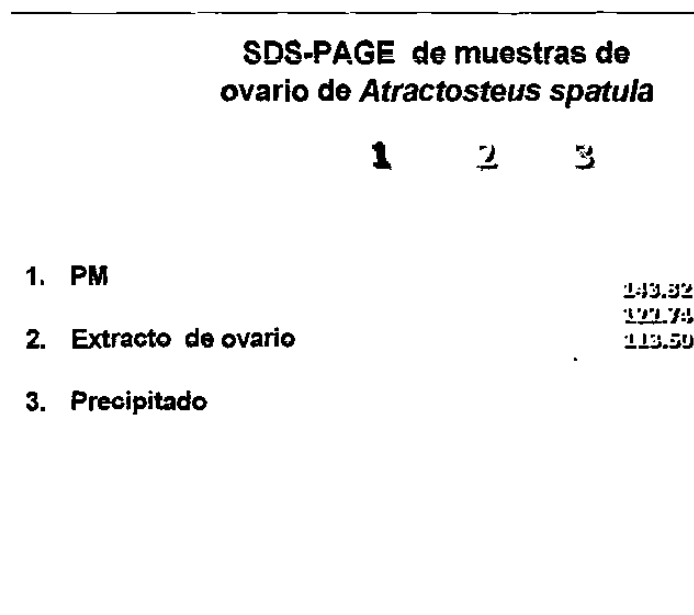


Figura 4. Gel de Poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes.

Kit del peso molecular (1), Extracto de ovario maduro de *Atractosteus spatula* (2), Precipitado del extracto (3).

b) Filtración en gel

La filtración en gel (Sephacryl-300 HR), permitió separar la muestra proteica en diferentes fracciones dentro de los cuales destacaron dos picos principales detectados a 280 nm. (Fig. 5). Un primer pico proteico comprendido entre las fracciones 32 a 37 y un segundo pico entre las fracciones 42 a 53. La naturaleza química de las moléculas contenidas en estos picos fue constatada, pudiéndose apreciar que en ambos casos se trataba de lipoglicoproteínas. (Figs. 6 y 7) Los resultados del barrido espectrofotométrico no revelaron ninguna longitud de onda relevante para la caracterización de carotenoides en las

moléculas (Fig. 8). De la misma manera, los resultados de la determinación de fósforo fueron negativos.

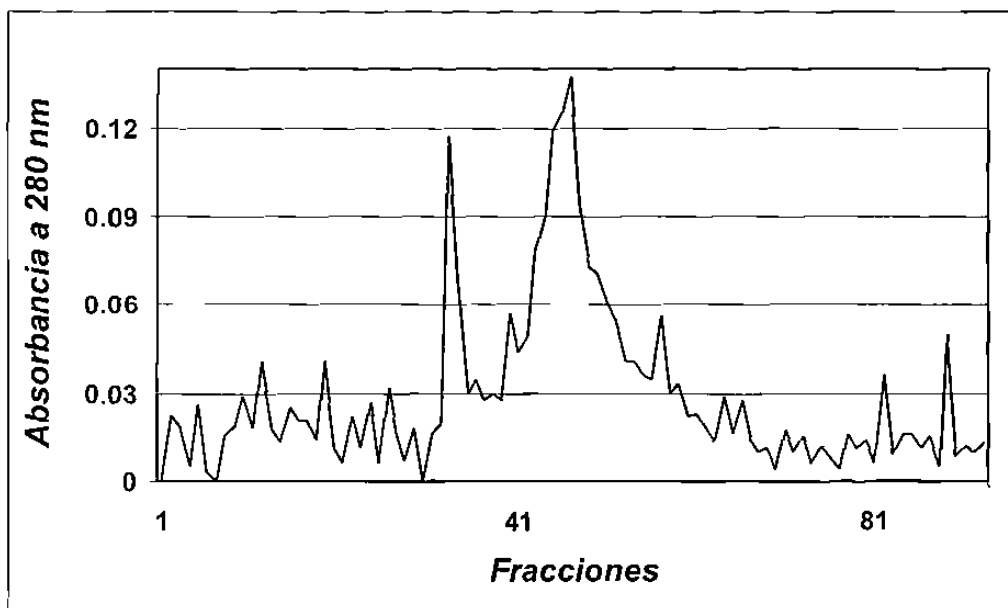


Figura 5. Fracciones proteicas (280 nm) del extracto de ovario maduro precipitado separado con Sephacryl-300

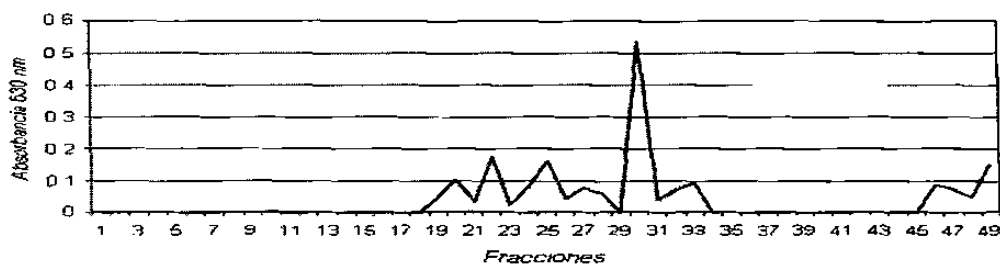


Figura 6. Fracciones del extracto de ovario maduro precipitado separados con Sephacryl-300 positivas a la prueba de la 1'ortotoluidina (630 nm) para detectar la presencia de carbohidrtaos

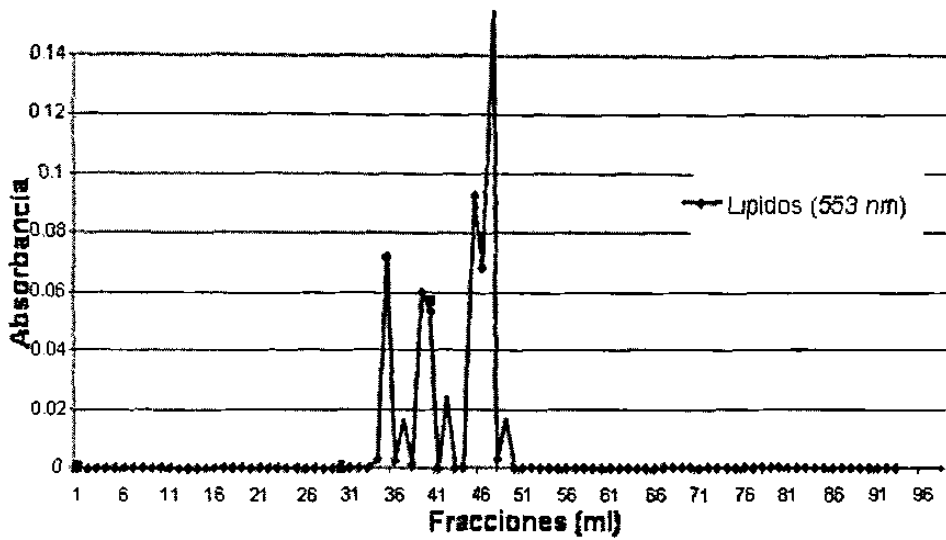


Figura 7. Fracciones del extracto de ovario maduro precipitado separados con Sephacryl-300 positivas a la prueba de Negro Sudan B (553 nm) para detectar la presencia de lípidos

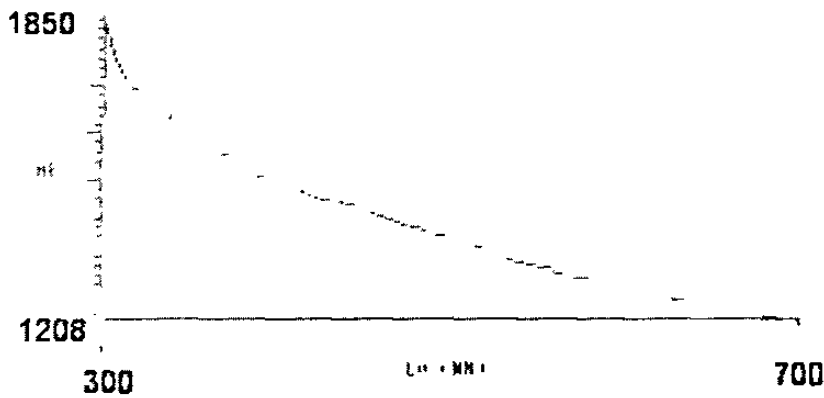


Figura 8. Barrido del extracto de ovario para detectar la presencia de carotenoides

Por otra parte, los resultados obtenidos de la filtración con Sepharosa-6B (Figura 9), mostraron siete picos proteicos, los cuales comprendieron las fracciones: 21, 31, 43, 45, 55, 62 y 81, respectivamente.

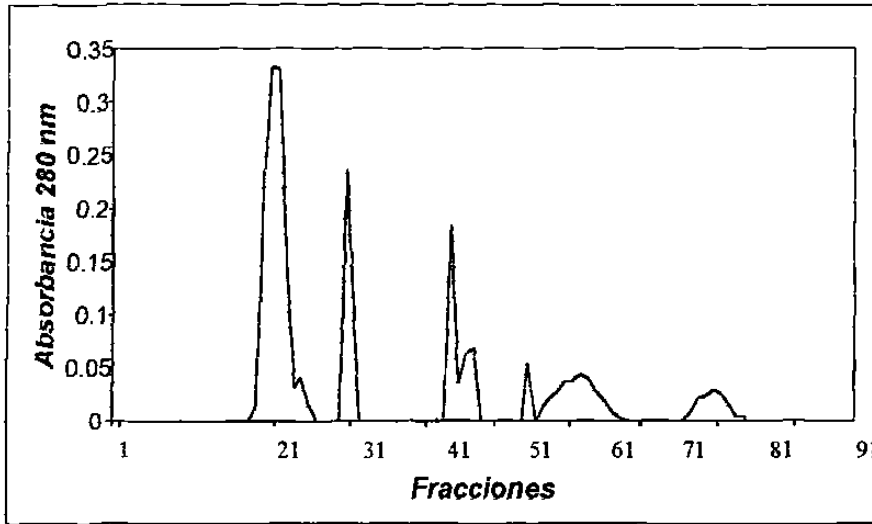


Figura 9. Fracciones proteicas (280 nm.) del extracto de ovario maduro precipitado separadas con Sepharosa-6B

Tanto los picos proteicos procedentes de la filtración con Sephacryl-300, como los obtenidos con Sepharosa-6B fueron sometidos a la técnica de Pruebas Cruzadas, utilizando el anticuerpo anti-VTG de *Atractosteus tropicus*, con lo cual se determinó que la fracción 47 de la filtración con Sephacryl-300, era la que correspondía a la molécula de la lipovitelina ovárica (Fig. 10). No obstante haberse apreciado una ligera reacción con las fracciones proteicas obtenidas mediante la filtración en Sepharosa-6B, la purificación se continuó con Sephacryl-300 ya que la reacción era más fuerte, con lo que se asumió una mayor integridad de las moléculas.

Pruebas Cruzadas

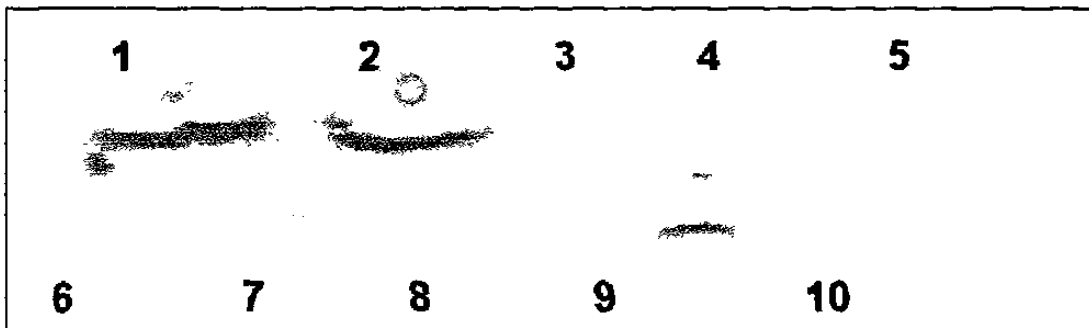


Figura 10. (1) Extracto de gónada de *A. tropicus* (2), Extracto de gónada de *A. spatula*, (3. 4. 5) Fracciones proteicas en Sepharosa-6B (6. 7. 8) Fracciones proteicas en Sephacryl-300, (9. 10) Fracciones proteicas en DEAE-Sephacel.

c) Intercambio de Iones

La fracción (47) de ovario maduro que resultó positiva al ser expuesta al anti-VTG de *A. tropicus*, fue sometida a cromatografía de intercambio de iones (DEAE-Sephacel) utilizando un gradiente lineal de KCl de 0-100% (Fig. 6), lo que permitió separar la mezcla proteica en dos fracciones mayoritarias (8 y 10). Correspondiendo la fracción 8 a la molécula de la lipovitelina ovárica, de acuerdo a la reacción positiva que mostró en la técnica de pruebas cruzadas (Fig. 11).

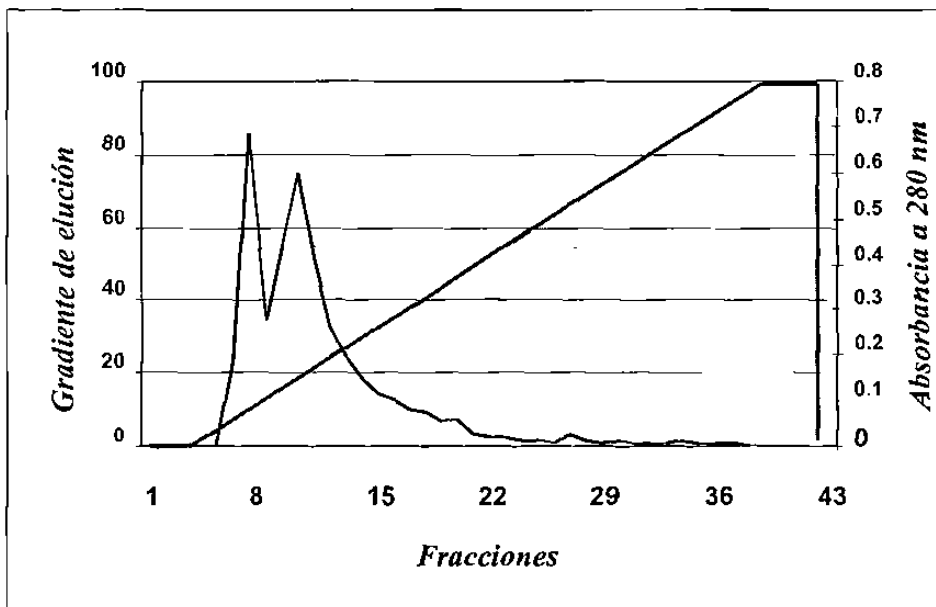


Figura 11. Fracciones proteicas, resultantes de la separación por filtración en gel con Sephacryl-300, sometidas a Cromatografía de intercambio de iones (DEAE-Sephacel). Gradiente lineal de KCl 0.5 M en buffer Tris-HCl 50 mM, pH8, flujo de 1 ml/min..

d) Electroforesis

Las fracciones obtenidas en filtración por Sephacryl-300 e Intercambio de iones (DEAE-Sephacel) fueron sometidas a electroforesis (Fig. 12), lo cual permitió observar un patrón similar al obtenido en cromatografía.

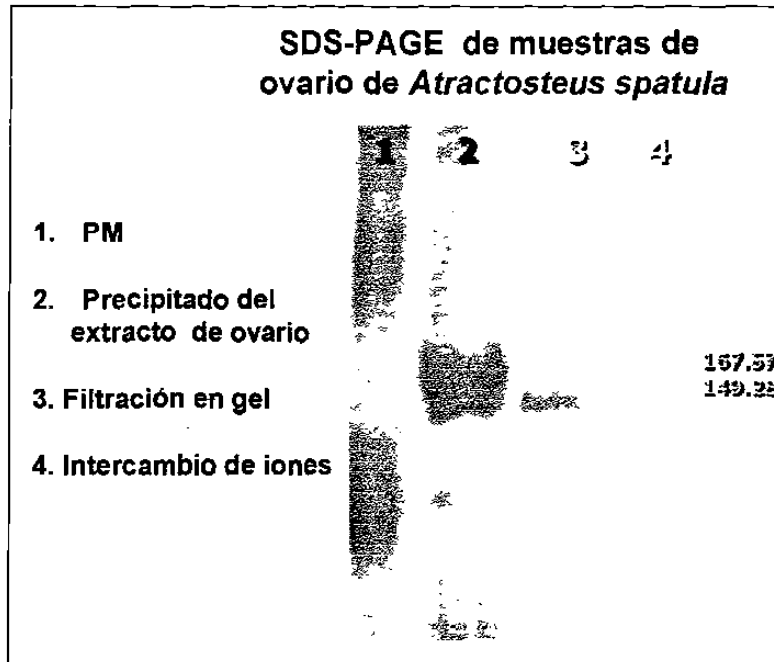


Figura 12. Determinación del peso molecular (miles de daltons) de la VTL, en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes.

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).

La integridad estructural y el reconocimiento de este complejo proteico por el anti-VTG, quedaron demostradas mediante la técnica de Western Blott (Fig.13)

1 2 3

Figura 13. (1) Filtración en gel, (2) Intercambio de iones, (3) Precipitado del extracto de ovario

e) **Determinación del Peso molecular de la VTL**

Filtración en gel

En base a la calibración de la columna y mediante el análisis de regresión lineal entre el factor de elución K_{av} y logaritmo de peso molecular, se logró determinar un peso molecular de 315, 500 daltons para la lipovitelina ovárica (VTL) (Fig. 14).

Los datos necesarios para el cálculo del K_{av} de las proteínas se encuentran detallados en la Tabla 4

Tabla 4. Valores utilizados en el análisis de regresión lineal.

	PM	Log. PM	Ve	Ve-Vo	K_{av}
Tiroglobulina	669,000	5.825	162	22	0.108
Apoferritina	443,000	5.646	186	46	0.227
β -Amilasa	200,000	5.301	210	70	0.345
Albúmina	66,000	4.819	228	88	0.434
Anhidrasa Carbónica	29,000	4.462	250	110	0.543
VTL	315,500	5.499	190	50	0.246

* $V_o = 140$ $V_t = 342.44$ $V_t - V_o = 202.44$

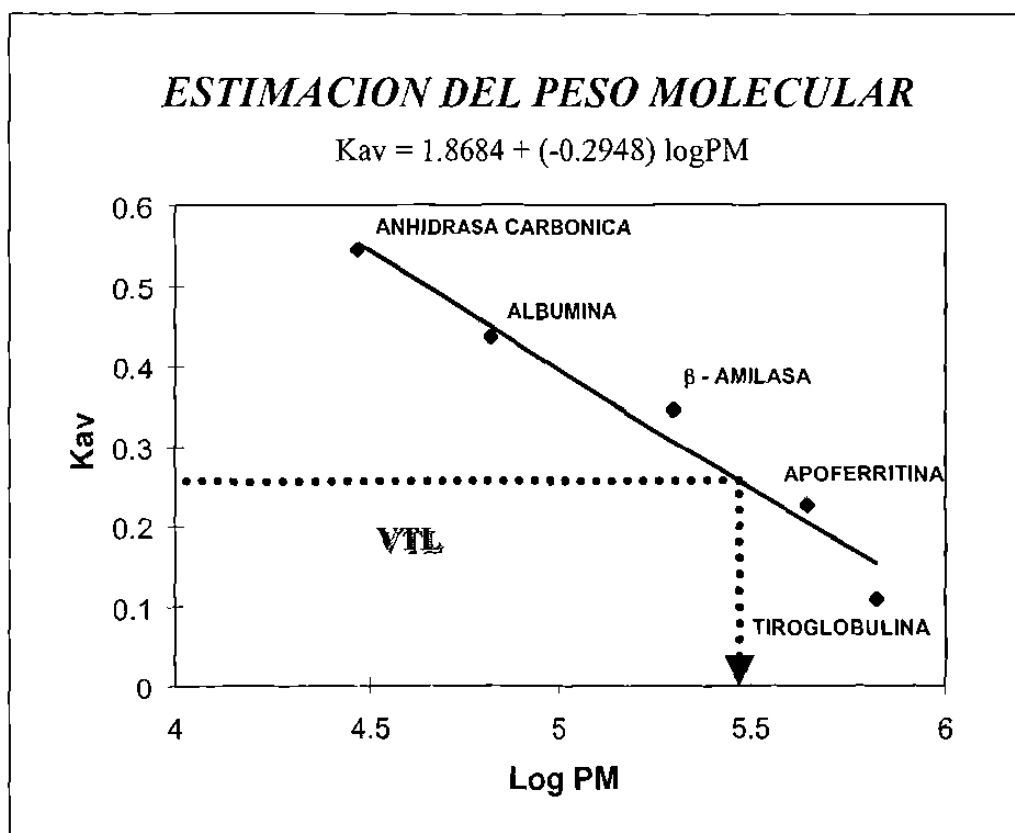


Figura 14. Determinación del peso molecular de la VTL, mediante el análisis de regresión lineal del K_{av} y $\log PM$.

Electroforesis

Como se mencionó anteriormente, el peso molecular de la lipovitelina ovárica (315, 500 Da), fue corroborado por electroforesis mediante la regresión lineal entre el parámetro R_f y el logaritmo del peso molecular, lo que condujo a una estimación de un peso molecular total de 316.85 daltons.

En la Figura 12, se muestra el gel de electroforesis en donde se pueden observar las dos bandas mayoritarias de la lipovitelina ovárica, con pesos moleculares de 167.57 Da y 149.28 Da.

f) Generación y Purificación de anticuerpos

Una vez confirmada la pureza de la VTL, se procedió a generar anticuerpos en conejos adultos de raza Nueva Zelanda. El suero de estos animales una vez precipitado fue

utilizado para aislar y purificar los IgG por medio de cromatografía de afinidad utilizando Proteína A como soporte (Fig. 15)

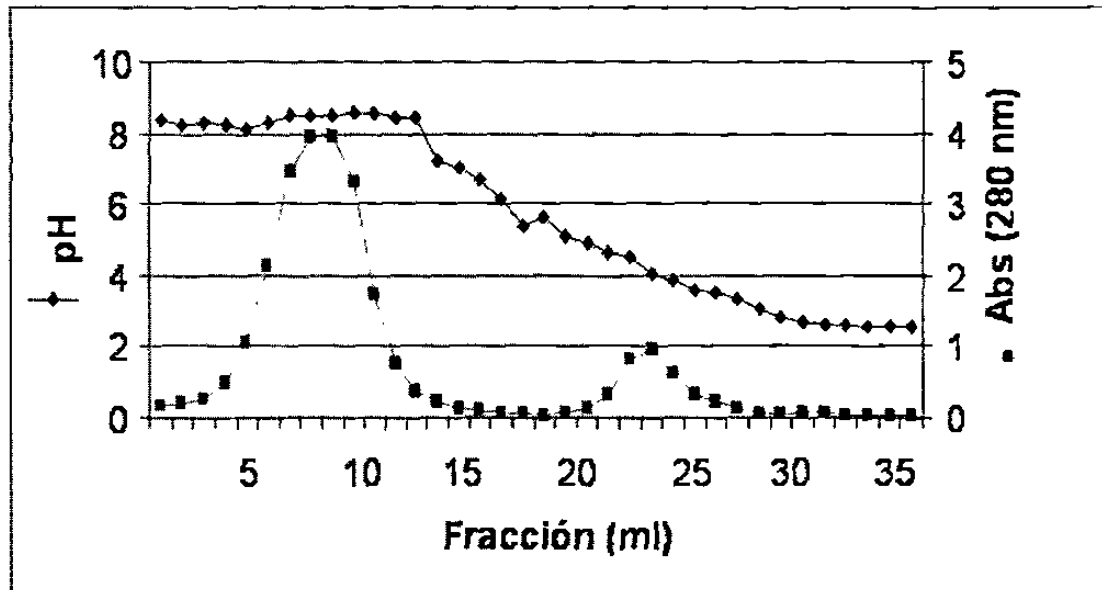


Figura 15. Espectro de elución de los IgG (fracciones 5 a 10) separados con Proteína A.

g) Sexado de organismos

Mediante las técnicas de electroforesis y pruebas cruzadas, se logró determinar el sexo de los 39 organismos adultos de *A. spatula* mantenidos en cautiverio en el Centro Acuícola Tancol. De estos, 25 organismos resultaron machos y 14 hembras.

En la Figura 16, se puede observar la precipitación de los antígenos plasmáticos con los anticuerpos anti-VTG de *Atractosteus tropicus*. De esta manera, destacan las muestras 3, 4, 6, 12, 13, 16, 22, 25, 28, 29, 30, 35, 37 y 39 como hembras.

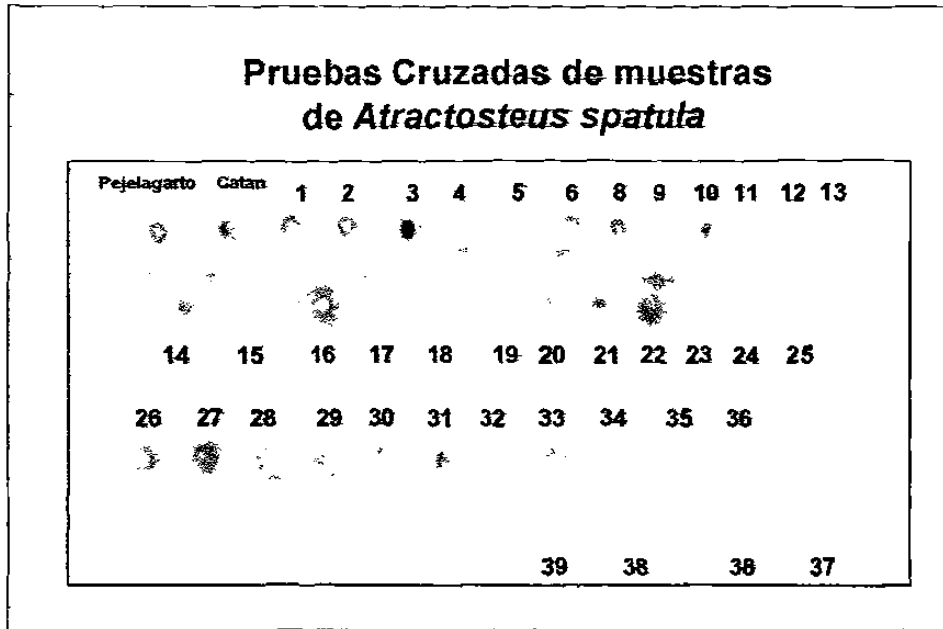


Figura 16. Sexado de *Atractosteus spatula*, mediante la técnica de pruebas cruzadas.

En la Figura 17, se muestra un gel de electroforesis en poliacrilamida, en donde es posible observar las bandas correspondientes de la lipovitelina ovárica en las hembras maduras de *Atractosteus spatula*.

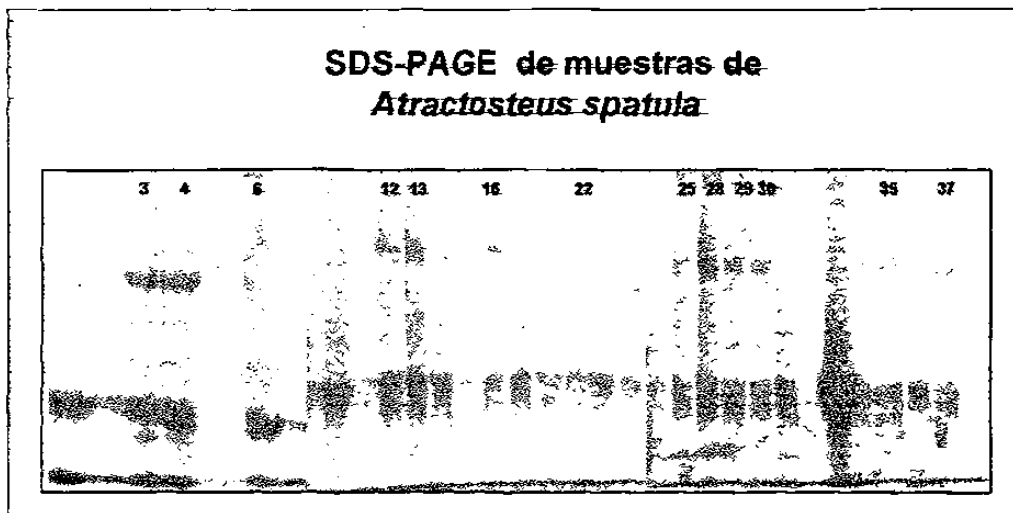


Figura 17. Sexado de *Atractosteus spatula*, mediante la técnica de electroforesis

En un intento por sexar a los organismos en base a sus características morfológicas se tomaron en cuenta el peso y longitud (Tabla 5). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos ni para el peso ($F: 3.94, P:0.0017, gl: 13$) (Fig. 18), ni para la longitud ($F: 0.657, P: 0.217, gl: 13$) (Fig. 19).

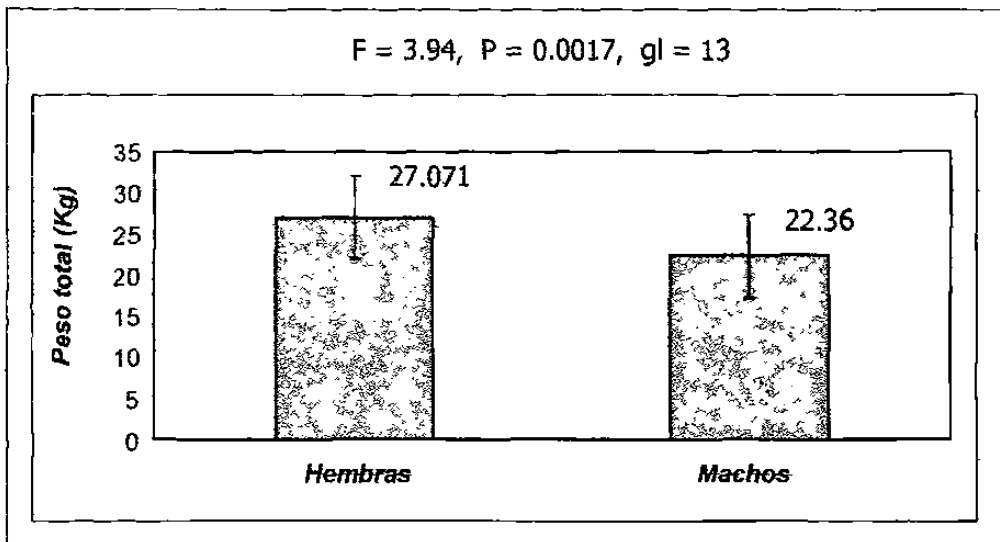


Figura 18. Valores promedio de peso (kg) de adultos de *Atractosteus spatula*.

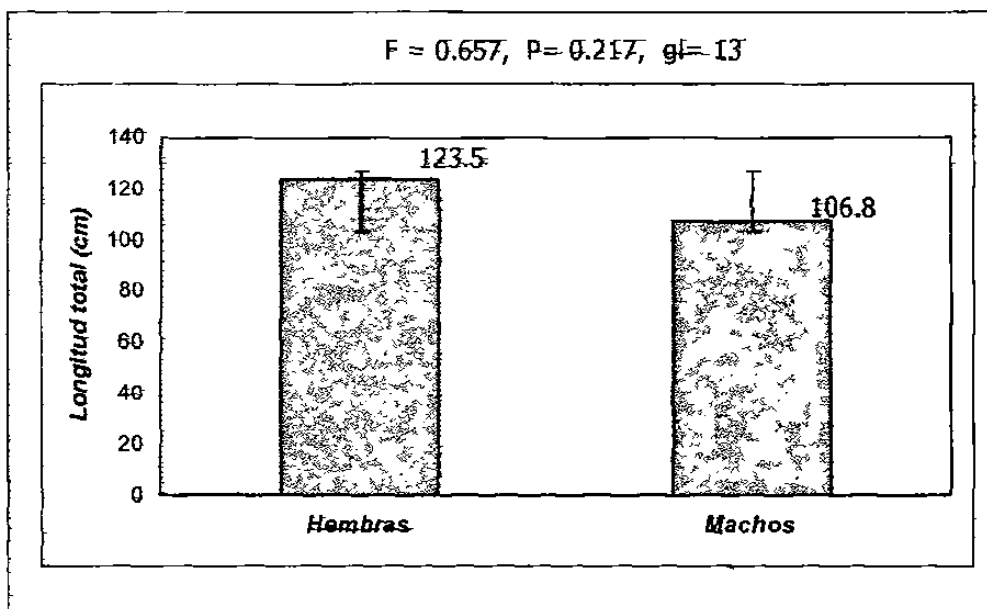


Figura 19. Valores promedio de longitud (cm) de adultos de *Atractosteus spatula* maduro, precipitado a 280 nm, en Sephacryl-300

Tabla 5. Características morfométricas utilizadas para determinar el sexo de los reproductores.

Las áreas sombreadas indican la presencia de hembras, determinadas tanto por precipitación con el anti-VTG de *A. tropicus* como por PAGE.

No. de organismo	Peso (Kg)	Talla (cm)	Sexo
1	22	111	Macho
2	19	108	Macho
3	22	116	Hembra
4	21	113	Macho
5	21	117	Macho
6	27	129	Hembra
7	30	138	Hembra
8	20	112	Macho
9	21	107	Macho
10	26	124	Hembra
11	30	132	Hembra
12	41	164	Hembra
13	24	120	Hembra
14	22	118	Macho
15	20	107	Macho
16	26	132	Hembra
17	25	120	Hembra
18	19	98	Macho
19	22	116	Macho
20	21	111	Macho
21	21	108	Macho
22	29	135	Hembra
23	17	103	Hembra
24	21	117	Hembra
25	23	114	Hembra
26	25	109	Macho
27	23	100	Macho
28	29	124	Hembra
29	30	133	Hembra
30	38	151	Hembra
31	22	100	Macho
32	22	101	Macho
33	23	113	Macho
34	24	115	Macho
35	24	110	Macho
36	20	93	Macho
37	20	85	
38	23	102	Macho
39	25	103	Macho

DISCUSIÓN

Purificación de la VTL

Ante la carencia de ejemplares adultos de catán en etapa reproductiva fue necesario llevara a cabo inicialmente diferentes aproximaciones experimentales en este estudio con una especie cercana: *A. tropicus*. Esto permitió no solo probar los protocolos de purificación de la VTG, sino también de disponer de un anticuerpo dirigido contra esta molécula, lo cual fue una herramienta esencial en la presente investigación. Esta escasez de adultos originó igualmente que no se recurriera a la purificación de la VTG, ya que se necesitaban cantidades importantes de plasma y que de manera alternativa se optara por purificar la VTL tomando ventaja de su similitud estructural e inmunológica.

En investigaciones anteriores, se han venido utilizado una gran variedad de técnicas para la purificación de la lipovitelina ovárica y/o la vitelogenina plasmática de distintas especies de peces, pero solo en algunas se ha considerado adicionar una etapa de separación inicial de precipitación con EDTA-MgCl₂ (Wiley *et al.*, 1979; Norberg & Haux, 1988; Inaba *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 1998), para concentrar y asilar por completo estas moléculas, del resto de los componentes del ovario o del plasma. Lo cual es una gran ventaja, ya que el EDTA-MgCl₂ se une de manera selectiva a los grupos fosfato de la molécula, aumentando su masa y propiciando así la precipitación. Adicionalmente, esta técnica resulta particularmente eficaz cuando estas moléculas se presentan en concentraciones elevadas (Norberg & Haux, 1988) como es el caso de la VTL concentrada en los ovarios de las hembras en etapa reproductiva. Así fue posible la obtención de la lipovitelina ovárica en su conformación nativa, para la realización de una purificación mas específica.

A pesar de la selectividad que ofrece esta técnica de precipitación, no resultó suficiente para la separación total de la lipovitelina ovárica de los otros componentes del ovario. Por lo cual fue necesario la recurrir a la combinación secuencial de la cromatografía de exclusión molecular e intercambio de iones, al igual que en investigaciones similares como es el caso de *Oncorhynchus mykiss* (Tyler & Lancaster, 1993), *Cyprinus carpio* (Tyler & Sumpter, 1990), *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994). Estas técnicas de cromatografía han sido utilizadas principalmente por que ofrecen la ventaja de poder

disponer de la molécula en fase líquida, lo que permite continuar con su ulterior purificación por medio de diferentes opciones (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 & Thomas, 1988; Tyler *et al.*, 1988; Tyler & Sumpter, 1990, Pelissero *et al.*, 1991, Tyler & 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). De aquí que este medio haya sido utilizado exitosamente en la purificación de la VTG y la VTL de otras especies de peces e.g. *Diodon holocanthus* (Fujita *et al.*, 1998). Adicionalmente, en un estudio colateral en el que se purificó la VTL y VTG de *A. tropicus* con Sepharosa-6B se observó una degradación de las moléculas, particularmente viéndose afectada una de las sub-unidades proteicas constituyentes de la VTG (Hernández, 2002). Esto, aunado al hecho de la mayor integridad de las moléculas obtenidas mediante la filtración con Sephacryl, originó la elección de este medio para realizar la purificación de la lipovitelina ovárica de *A. spatula*.

Los resultados obtenidos con respecto a la filtración en gel, mostraron la necesidad de recurrir a un segundo proceso de purificación, ya que se obtuvieron varias proteínas dentro del mismo rango de peso molecular que la lipovitelina ovárica. Por lo que se procedió a emplear la cromatografía de intercambio de iones (DEAE-Sephacel) (Norberg & Haux, 1985; Tyler & Sumpter, 1990; Tyler & Lancaster, 1993), ya que permite separar moléculas con rango de peso molecular similar, por medio de su carga iónica. Aunque esta técnica se ha utilizado regularmente con un gradiente lineal de NaCl (Kanungo *et al.*, 1990; Mañanós *et al.*, 1994; Nuñez *et al.*, 1996; Heppell & Sullivan, 1999), en el presente estudio se tuvo que recurrir a una modificación del protocolo, adoptando en su lugar un gradiente lineal de 0 - 100% de KCl (0.35M, pH 8), tal como lo recomienda Wiley *et al.*, (1979), para la purificación de la VTG de *Xenopus laevis*. Esto permitió obtener así, la separación total de la lipovitelina ovárica de *A. spatula* al 4% de KCl (0.5 M, pH 8).

Por otra parte, la confirmación estructural, por sus constituyentes químicos, y funcional, por el hecho de que solo se presentara en hembras y por su reacción con el

anticuerpo anti-VTG de pejelagarto, corroboran que se trata efectivamente de la VTL ovárica del catán

A este respecto, cabe mencionar que aunque la VTL y la VTG están consideradas como lipoglicocaretenofosfoproteínas, en este estudio solo se pudo demostrar su carácter lipídico y glucídico de la VTL. Esto se puede explicar por el hecho de que la precipitación EDTA-MgCl₂ utilizada como etapa de pre-purificación, implica la reacción de estos compuestos con los grupos fosfatos que forman las cargas superficiales de la proteína (Wallace *et al.*, 1967). Lo cual lleva a suponer la modificación estructural de estos componentes durante la precipitación. Por otra parte, en lo concerniente a la ausencia de carotenoides, es importante señalar que mientras que en otros lepisosteidos predomina el color verde olivo o verde grisáceo (Netch y Witt, 1962; Resendez, y Salvadores, 1983; Pérez-Sánchez, 1995), en los catanes los ovarios y los huevos son blancos. De hecho, se ha atribuido la toxicidad de los huevos de *A. spatula* a esta ausencia de coloración, argumentando que mientras que los huevos de otros lepisosteidos, como los de *L. oculatus*, que son muy pequeños con matices verde-grisáceos y los cuales son desovados en áreas de densa vegetación, los del catán son grandes, blancos y generalmente son desovados en áreas más desprotegidas, lo que sugiere la necesidad de una mayor toxicidad (Burns *et al.*, 1981).

Determinación del peso molecular de la VTL

La gran variedad de técnicas (ultracentrifugación, cromatografía, electroforesis, etc) utilizadas para la determinación del peso molecular de la VTG y la VTL de peces ha provocado a menudo sesgos en las estimaciones. Esto ha sido demostrado en investigaciones anteriores, en las cuales se han comparado diferentes aproximaciones para determinar el peso molecular de la VTG y la VTL, como en el caso de *Dicentrarchus labrax*, especie para la cual se estimaron pesos moleculares para la VTG mediante filtración en gel y SDS-PAGE de 445 kDa y 510 kDa, respectivamente (Mañanós *et al.*, 1994). De la misma manera, Campbell & Idler (1980), reportaron pesos moleculares de 342, 440 y 470 kDa para la VTG de *Salmo gairdneri* mediante ultracentrifugación, filtración en gel y SDS-PAGE, respectivamente. En contraste con lo anterior, Tyler *et al.*, (1988) y Wagboe &

Kjartan (1988) determinaron un peso molecular de 440 kDa para la VTG de *Salmo gairdneri* mediante filtración en gel y HPLC respectivamente.

A esto cabe añadir que la determinación del peso molecular únicamente por electroforesis, no siempre resulta satisfactoria puesto que las proteínas son separadas en función a una combinación de su carga y de su peso molecular, sin embargo la suma de estas propiedades no proporciona una medida absoluta, considerando que una zona electroforética puede cubrir proteínas con la misma movilidad, pero con un peso molecular y cargas diferentes, y por consecuencia pueden presentar propiedades inmunologicamente diferentes (Clausen, 1988). Sin embargo, la cercanía en las estimaciones encontradas en este estudio mediante cromatografía de exclusión molecular (315.5 kDa) y electroforesis (316.85 kDa - suma de las sub-unidades obtenidas) vienen a corroborar la autenticidad del peso molecular de la VTL de catán.

Sexado de los organismos de campo

La determinación sexual en los peces puede llegar a representar un problema muy serio dentro de la acuicultura, ya que en ocasiones no se cuenta con un método preciso para determinar el género de los individuos. Este aspecto es de importancia fundamental al momento de preparar lotes de reproductores ya que así se puede tener una mejor estrategia de manejo, al proporcionar condiciones diferentes (temperatura, alimentación, etc.) para hembras y para machos. Igualmente, es deseable la identificación de los géneros en el momento de la reproducción, ya que las mayores posibilidades de fertilización se obtendrán al acercarse a las proporciones que se observan en el medio ambiente natural. En referencia a lo anterior, cabe señalar que 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-Lomeli, 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*. Mientras que en el caso de *A. spatula* la proporción sexual que se ha venido utilizando en el Centro Acuícola Tancol durante la época reproductiva en cautiverio es de 2 machos por hembra (Morales, 1987). Lo cual contrasta con lo reportado por Rodríguez *et al.* (1998) quienes marcan una proporción de 10.5: 1 machos por hembra en la presa Vicente Guerrero, localizada en Tamaulipas. Sin embargo, al parecer esta proporción no se mantiene, ya que una estimación realizada en el mismo lugar en el 2000 señala una proporción de 7.6: 1 machos por hembra (González-García y García de León, 2000), mientras que en el 2001 los mismos autores (García de León *et al.*, 2001) mencionan que la proporción es solo de 5:1. 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 válido 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.

Por otra parte, la existencia de crecimiento diferencial entre machos y hembras para algunas especies (*L. platostomus*, *L. ocellatus* y *L. platyrinchus*), se vuelve menos marcada con la edad (Suttkus, 1963). Esta ausencia de dimorfismo sexual se acentúa en condiciones de cautiverio (Hernández, 2002). Aunado a esto se tiene que considerar el largo periodo de tiempo en que tardan en alcanzar su primera madurez sexual (de 4-6 años) (Mendoza *et al.*, 2000^a). Esto ha propiciado que se recurra comúnmente a la observación de las

características externas de los organismos para tratar de discernir el sexo. Así, se han llevado a cabo apreciaciones en las que se ha considerado como característica distintiva el tamaño del hocico (Suttkus, 1963; León *et al.*, 1978), la forma y tamaño del vientre, el peso y longitud total del organismo (León *et al.*, 1978; Contreras y Marañón, 1991). Sin embargo, estos métodos carecen de precisión principalmente cuando se trata de sexar organismos inmaduros o en sus primeras etapas de desarrollo gonadal, ya que se ha establecido 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 & Witt, 1962; Morales, 1987; Bejerano *et al.*, 1997).

La deficiencia de estos métodos vino a quedar de manifiesto en el presente estudio al no registrarse diferencias significativas con referencia al peso o la longitud total de los individuos muestreados.

Lo anterior ha originado, que como en el presente estudio, sean varias las investigaciones que se han apoyado en la naturaleza química (Calcio - Balbontin *et al.*, 1978; de Vlaming *et al.*, 1980; Nagler *et al.*, 1987; Linares-Casenave, 1990; Doroshov, *et al.*, 1997; Björnsson *et al.*, 1998; Fósforo ligado a proteínas – Yao and Crim., 1996; Craik y Hervey, 1984).o inmunológica de la VTG y VTL ya sea para la diferenciación de los sexos o para evaluar la condición gonádica (Copeland, 1986; Copeland & Thomas, 1988; Benfey *et al.*, 1989; Tyler & Sumpter, 1990; Mañanós *et al.*, 1994; Kishida & Specker, 1994; Fujita *et al.*, 1998; Takemura & Oka, 1998).

Los resultados de este estudio indicaron la posibilidad de identificar con precisión el sexo de los 39 ejemplares de catán mantenidos en cautiverio por medio de una reacción inmunológica entre la VTL y los anticuerpos generados contra esta molécula purificada. Lo anterior justifica plenamente el establecimiento de un inmunoensayo más rápido, preciso y sensible y con el cual se puedan procesar un mayor número de muestras tal como el ELISA (enzyme-linked immunoassay). Cabe notar la consistencia entre las reacciones cruzadas y la identificación de las bandas típicas de la VTL, lo cual viene a corroborar la validez de esta molécula como indicador bioquímico del sexo y del estado de madurez de los individuos de catán muestreados.

Por otra parte, esto viene a constatar resultados similares encontrados con otros lepisosteidos (Hernández, 2002) en los cuales se identificó el sexo de ejemplares de *A. tropicus* mediante una reacción inmunológica entre la VTG plasmática y el suero anti-VTG producido a partir de la proteína purificada.

Igualmente, el hecho de que la VTL de catán fuera reconocida por el anti-VTG de pejelagarto indica no solo la baja especificidad intergenérica de estas moléculas, posiblemente debido a la cercanía evolutiva de ambas especies, sino también la similitud estructural de la VTG y la VTL confirmándose así que ambas moléculas poseen propiedades antigénica que las hacen inmunológicamente indistinguibles como ha sido demostrado con otras especies como: *Oncorhynchus mykiss* (Tyler, 1993); *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1994); *Dicentrarchus labrax* (Mañanós *et al.*, 1994); *Plectropomus leopardus* (Takemura and Teruya, 1997) y *Verasper moseri* (Matsubara and Koya, 1997).

Adicionalmente, el hecho de poder monitorear una proteína que evoluciona de manera concomitante al desarrollo gonádico, proporciona un medio eficaz para la evaluación de los protocolos de inducción hormonal. Esto tiene una relevancia particular en el caso del catán, ya que debido a su condición ginoaria no es posible evaluar la maduración ovocitaria por medio de la extracción de muestras de gametos de las gónadas (canulación). De hecho, hasta el momento este último método fue ensayado en hembras de pejelagarto sin haber podido obtener muestras de gametos femeninos con facilidad debido al estrechamiento del oviducto que dificulta el paso de la cánula y provoca daños en este tejido (Páramo, 2001, citado por Hernández, 2002) Esto ha propiciado que se recurra a otro tipo de métodos como son los histológicos (Pérez, 1995; Pérez y Páramo, 1998), o los quirúrgicos (Ferrara & Irwin, 2001), con la desventaja de implicar la muerte del organismo

La utilidad de los resultados del presente estudio se refleja no solo en una posibilidad de llevar a cabo una mejor gestión de los reproductores, sino también por el hecho de poder estimarse la proporción sexual de los ejemplares colectados por las pesquerías considerando que la VTG también se puede cuantificar en extractos de músculo (Bridges *et al.* 2000; Heppell y Sullivan, 2000; Bridges, 2002; Grau, 2002) y mucus (Kishida, *et al.* 1992; Kishida, and Specker, 1993 y 1994; Chang *et al.*, 1996).

CONCLUSIONES

La combinación secuencial de la técnicas de precipitación con EDTA-MgCl₂, filtración con Sephacryl-300, e intercambio de iones con DEAE-Sephacel permitió la adecuada purificación de la molécula de lipovitelina ovárica de *Atractosteus spatula*.

La autenticidad de la molécula quedó confirmada tanto por sus características estructurales (físico-químicas) como funcionales (inmunológicas y fisiológicas).

Se logró establecer de manera certera la identificación de los géneros de los ejemplares adultos de catán mantenidos en cautiverio con el seguimiento por electroforesis (PAGE), así como por inmunodetección de la molécula de lipovitelina, con lo que se reafirma su valor como marcador bioquímico.

LITERATURA CITADA

- ALLEN, R. C. and BUDOWLE B. (1994). Gel electroforesis of proteins and nucleic acids; Selected techniques. *Walter de Gruyter, Berlin*, 210 - 211.
- BALBONTIN F, X ESPINOSA, and PKT PANG. (1978). Gonadal maturation and serum calcium levels in two teleosts, the hake and the killifish. *Comp. Biochem. Physiol.* 61A: 617-621.
- BARR, A. W. (1968). Patterns of ovarian activity. *Perspectives in endocrinology hormones in the lives of lower vertebrates.* Barrington, E. and Bakers J. C. (eds.) *Academic Press, N.Y.*, pp 583.
- BENFEY, T. J., DONALSON, E. M., and OWEN, T. G. (1989). An homologous radioimmunoassay for coho salmo (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, whit general applicability to other Pacific salmonids. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 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
- BEJERANO, G., G. MARQUEZ Y S. PÁRAMO (1997). Propuesta metodológica para la inducción al desove del pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Memoria de la Semana de divulgación y video científico 1997. *Secretaría de Servicios Académicos. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.* Pp 80-83
- BIDWELL, CH. A., KROLL, J. K. SEVERUD, E. DOROSHOV, S. I. and D. M. CARLSON. (1991). Identification and preliminary characterization of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) vitellogenin mRNA. *Gen. Comp. Endocrino.* 83: 415-424.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- BRIDGES, C.R., P. SCHRÖDER ,V. SUSCA, A CORRIERO, M. DEFLORIO and GREGORIO DE METRIO (2000). A new muscle biopsy technique for sex and sexual maturity determination in large pelagic fishes. Report SCRS/2000/192. 6 pp.

- BRIDGES (2002).** Sexual identification and development in the swordfish - improved determination tools for more efficient stock assessment and implementation of control measures. The European Commission Community Research. Fifth Framework Programme (1998-2002). 5. Sustainable Agriculture, Fisheries and Forestry. SIDS-CONTRACT NUMBER: QLRT-1999-01567
- BRION, F., ROGERIUEUX, F., NOURY, P., MIGEON, B., FLAMMARION, P., THYBAUD, E. and POCHER, J-M.** (2000). Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications.*, 737: 3-12
- BURNS, T.A, D.T. STALLING and W. GOODGER,** (1981) Gar ichthyotoxin (*Lepisosteus sp.*): its effect on crayfish, with notes on bluegill sunfish. *Southwestern Naturalist*, 25(4): 513-515.
- CALLARD, I. D., RILEY, D. and L. PEREZ** (1990). Vertebrate vitellogenesis: molecular model for multihormonal control of gene regulation. *Progress in Comparative Endocrinology.* 343-348.
- CAMPBELL, C. M. and D. R. IDLER.** (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.
- CARNEVELLI, O. and P. BELVERDE.** (1991). Comparative studies of fish, amphibian, and reptilian vitellogenins. *The Journal of Experimental Zoology.*, 259: 18-25.
- CLAUSEN, J.** (1988). *Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules.* Burdon, R. and P. Van Knippenberg (Eds), Elsevier, Amsterdam. 464 pp.
- COPELAND, P., A. and P. THOMAS.** (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.
- COPELAND, P. A., SUMPTER, J. P., WALTER, T. K. and CROFT, M.** (1986). Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)

- at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 38B: 487 - 493.
- 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.
- COVENS, M., CONVENS, L., OLLEVIER, F. and A. DE LOOF.** (1987). 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, J., C., A. and S. M. HARVEY.** (1984). A biochemical method for distinguishing between the sexes of fishes by the presence of yolk protein in the blood. *J. Fish Biol.*, 25: 293 - 303.
- CUISSIET, B.; PELISSERO, C.; LE MENN, F. and NUÑEZ RODRIGUEZ.** (1991). ELISA for Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) Vitellogenin. *ACIPENSER, CEMAGREF.*, 107-111.
- CHAN, S. L., TAN, C. H., PANG, M. K. and T. J. LAM.** (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.
- CHAVEZ-LOMELÍ, M, A. E. MATTHEWS Y M. PÉREZ-VEGA** (1989). Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura. INIREB FUCID, Xalapa, Veracruz, Mex. 19- 27.
- CHING-FONG, CH., EN-LIEN, L., BIH-YUN, L. and SHAN-RU JENG.** (1996). Characterization of vitellogenin induced by estradiol-17 β in protandrus black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Fish Physiology and Biochemistry.*, 15: 11-19.
- DE VLAMING, L. V., WILEY, S. H., DELAHANTY, G. and R. A. WALLACE.** (1980). Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B: 613-623.
- DUBOWSKI, K.M.** (1962). An O-toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clin. Chem.* 8:215-235

- DUNCAN, S. (1990). A user guide to protein A. (Ch. 10) In: *Laboratory Methods in Immunology, Vol II*. Zola, H. (ed.), 169-180.
- FERRARA, A. and E. IRWIN (1999). Standardized procedure for sex determination in Lepidosteidae. *American Fisheries Society Annual Meeting*, August 29-Sept.2. Charlotte, North Carolina.
- FISKE, C. and Y. SUBBAROW (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: 375-400.
- FUJITA, T.; TAKEMURA, A. and K. TAKANO. (1998). Immunochemical detection of precursor proteins of yolk and vitelline envelope, and their annual changes in the blood of *Diodon holocanthus*. *Journal of Fish Biology*, 52: 1229-1240
- GARCIA DE LEON, F., L. GONZALEZ-GARCIA, J. HERRERA-CASTILO, KO. WINWMILLER and A. BANDA-VALDES (2001). Ecology of the alligator gar *Atractosteus spatula*, in the Vicente Guerrero reservoir, Tamaulipas, México. *The Southwestern Naturalist* 46(2):151-157.
- GONZALEZ-GARCIA, L. y F. GARCIA DE LEON (2000). Resultados preliminares de estudios sobre aspectos reproductivos del catán, *Atractosteus spatula* Lacepede, en la Presa Vicente Guerrero, Tamaulipas, México. *Proceedings of the Desert Fish Council. Vol XXXI(1999 Symposium)*. Published November 1, 2000. pp 29.
- GRAU, E.G. (2002). developing methods to assess sex and maturational stage of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and swordfish (*Xiphias gladius*). IMAR, PFRP ANNUAL PROGRESS REPORT. FY 2002
- HENDERSON, C. and R. WOLF. (1992). Immunodetection of proteins by Western Blotting (Ch.24). In: *Methods in molecular biology, Immunochemical protocols. The press Inc., Totowa NJ*. M.Manson (ed.), 10: 221-233.
- HEPPELL, S.A. and C.V. SULLIVAN (1999). Gag (*Mycteroperca microlepis*) vitellogenin: purification, characterization and use for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper. *Fish Physiology and Biochemistry*. 20: 361-374.
- HEPPELL S.A. and C.V. SULLIVAN (2000) Identification of Gender and Reproductive Maturity in the Absence of Gonads: Muscle Tissue Levels of Sex Steroids and

- Vitellogenin in Gag (*Mycteroperca microlepis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 148-159.
- HO, S.** (1987). Endocrinology of vitellogenesis. *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. Norris D. O. and Jones R. E. (eds). Plenum Press, N. Y., 145-169 pp.
- HORI, S. H., KODAMA, T. and K. TANAHASHI.** (1979). Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *General and Comparative Endocrinology.*, 37: 306-320.
- ILDER, D. R., HWANG, S. J. and L. W. CRIM.** (1979). Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *J. Fish. Res. Board Can.*, 36: 574-578.
- INABA, KAZUO., CORAZON, C. BUERANO, FILIPINAS, F. NATIVIDAD, and MASAOKI MORISAWA.** (1997). Degradation of Vitellogenins by 170 kDa Trypsin-Like Protease the plasma of the Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118B, 85 - 90.
- JOHANNING, K. M. and J. L. SPECKER.** (1995). Characterization of yolk proteins during oocyte development of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B (2): 177-189
- JOHNSEN, H., TVEITEN, H., WILLASSEN, N. and ARNESEN, A.** (1999). Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of enzyme-linked immunosorbent assay. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 124 (3): 355-362.
- KISHIDA, M., T. R. ANDERSON, and J. L. SPECKER.** 1992. Induction by β -estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): characterization and quantification in plasma and mucus. *Gen. Comp. Endocrin.* 88:29-39.
- KISHIDA, M. and SPECKER, J.L.** (1994) Vitellogenin in the surface mucus of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Possibility for uptake by the free-swimming embryos. *J. Exp. Zool.* 268, 259-268.
- KISHIDA, M. and SPECKER, J.L.**(1993). Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Induction of two forms by estradiol, quantification in the plasma,

148945

- and characterization in plasma and mucus. *Fish Physiology and Biochemistry* 12, 171-182.
- KANUNGO, J., PETRINO, T. R. and R. A. WALLACE.** (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
- KARP, G.** (1987). Biología celular. Segunda edición. *Editorial McGraw-Hill, S. A. de C.* V. Pp.949.
- KISHIDA, M. and J. L. SPECKER.** (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.
- KOMATSU, M., MATSUMOTOAND, W. and S. HAYASHI.** (1996). Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from Eel *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B (3): 561-571.
- LaFLEUR, G. J., BYRNE, B. M., KANUNGO, J., NELSON, L. D., GREENBERG, R. M. and R. A. WALLACE.** (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.
- LAINE, A.** (1992a). Quantitative and Qualitative immunoelectrophoresis. (Ch.20). In: Methods in molecular biology, Immunochemical protocols. *The press Inc., Totowa NJ.* M.Manson (ed)., 10: 195-200.
- LAINE, A.** (1992b). Rocket immunoelectrophoresis technique or electroimmunodiffusion. (Ch.21). In: Methods in molecular biology, Immunochemical protocols. *The press Inc., Totowa NJ.* M.Manson (ed)., 10: 201-205.
- LAM, T. J.** (1985). Induced spawning in fish. Reproduction and culture of milkfish. *Oceanic Institute, Hawaii and Tungkang Marine Laboratory, Taiwan.*, Lee, C. S. and Lio, I. C. (eds)., 14-56.
- LANCASTER, P. M. and CH. R. TYLER.** (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.

- LEON, R. R., AGUILAR y Y. HERNANDEZ.** (1978). Estudio sobre la biología y el cultivo artificial del manjuari (*Atractosteus tristoechus*) Bloch and Schneider. *Acuacultura. Ministerio de la Industria Pesquera. Dir. Ramal de Acuacultura. INVESTIGACS.* 85 pp
- LINHARTT, O., KUDO, S., BILLARD, R., VLASTIMIL, S. and E. V. MIKODINA.** (1995). Morphology, composition and fertilization of carp egg: a review. *Aquaculture.*, 75-93.
- LIZANA, J.** (1989). Immunoelectrophoresis. In:Protein purification: Principles, high resolution methods and applications. J.C. Janson & L. Ryden (eds.). VCH Publisher, NY. (Ch.3).pp 404-427.
- LOMAS, D., ROUBAL, W., MOORE, J. and JOHNSON, L.** (1998). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology.*, 121 (4): 425-436.
- MAÑANÓS, E., NUÑEZ, J., ZANUY, S., CARRILLO and F. LE MENN.** (1994).Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Vitellogenin. II-Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B (2): 217-223.
- MATSUBARA, T. and Y. KOYA.** 1997. Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.* 278: 189-200.
- MATSUBARA, T. and K. SAWANO.** (1995). Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *The Journal of Experimental Zoology.*, 272: 34-45.
- MATSUBARA, T., T. WADA and A. HARA.** 1994. Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109B (4): 545-555.

- MENDOZA, R.** (1992). Etude de la vitellogenèse et de sa stimulation chez des crevettes Pénéides par des facterus hétérologues et homologues. *These de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*. pp. 68-71.
- MENDOZA, R.** (1994). Utilización de métodos inmunológicos en el estudio de la nutrición de los organismos acuáticos. *In: Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Mendoza, R., Cruz, E., Ricque, D. (ed.), 129-155.
- MENDOZA, R., J. GUILLAUME. and C. FAUVEL.** (1993). Homologous ELISA procedure for the determination of penaeid shrimp vitellogenin, *Aquat. Living. Resour.*, 6: 39-48.
- MENDOZA, R., AGUILERA, C., MONTEMAYOR, J., RODRIGUEZ, G. Y R. CASTRO.** (2000a). Aspectos reproductivos de los lepisosteidos, con énfasis en las perspectivas para el control de la reproducción del catán (*Atractosteus spatula*). *In: Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura, INP-SEMANARP*. Álvarez Torres, P. (ed.), 103-121.
- MENDOZA, R., AGUILERA, C., MONTEMAYOR, J., RODRIGUEZ, G. y G. MARQUEZ.** (2000b). Biología de los lepisosteidos, y estudios orientados hacia la recuperación de las poblaciones naturales del catán (*Atractosteus spatula*) (Lacepède, 1803). *In: Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura, INP-SEMANARP*. Alvarez Torres, P. (ed.), 281-291.
- MOMMSEN, T. P. and P. J. WALSH.** (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.
- MOSCONI, G., CARNEVALI, O., CARLETTA, R., NABISSI, M. and POLZONETTI-MAGNI, A.** (1998). Gilthead seabream (*Sparus aurata*) vitellogenin: purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Gen.Comp.Endocrinol.* 110 (3): 252-261.

- 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., YOSHIKUNI, M., YAMASHITA, M. SAKAI, N. and TANAKAN M.** (1993). Molecular endocrinology of oocyte maturation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11: 3-14.
- NETCH, L. and A. WITT,** (1962) Contributions to the life history of the longnose gar (*Lepisosteus osseus*). *Trans. Amer. Fish. Soc.* 91(3):251-262.
- NG, T. B. and D., R. IDLER.** (1983). Yolk formation and differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology*. IX: 373-404.
- NISHI, K., CHIKAE, M., HATANO, Y., MIZUKAMI, H., YAMASHITA, M., SAKAKIBARA, R. and TAMIYA, E.** (2002). Development and application of monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.* 132C (2): 161-169.
- NORBERG, B. and C. HAUX** (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. and C. HAUX** (1988). An homologous radioimmunoassay for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin. *Fish. Physiol. Biochem.*, 5 (2): 59-68.
- NUÑEZ, J., BON, E. and F. LE MENN.** (1996). Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.*; 274: 163-170.
- OPRESKO, L., WILEY, H. S. and R. WALLACE.** (1981). Receptor-mediated binding and internalization of vitellogenin by *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.*, 91, 218a.
- PEREZ, L. E. and I. P. CALLARD.** (1993). Regulation of hepatic vitellogenin synthesis in the little skate (*Raja erinacea*): Use of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Exp. Zool.*, 266: 31-39.
- PÉREZ, E.** (1995). Efecto de la gonadotropina coriónica humana (GCH) en la maduración gonádica del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) en condiciones de laboratorio. Tesis, Licenciatura en Biología. UJAT. 28pp.

- PÉREZ, S. E. y D. S. PÁRAMO. (1998). Estudio histológico de las gónadas de pejelagarto *Atarctosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae): *Universidad y Ciencia.*, 14 (27): 69-82.
- PETER, E., R. (1993). Concluding remarks: Second International Symposium on Fish Endocrinology. *Fish Physiology and Biochemistry.*, 11: 445-451.
- PELISSERO, C.; BENNETAU, B.; BABIN, P.; LE MEN, F. and J. DUNOGUES. (1991). The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Journal Steroid Biochemical Molecular*; 38: 293-299.
- PHARMACIA BIOTECH. (1999). Gel filtration; theory and practice. Sixth edition. pp.103.
- POWELL, F., ZOHAR, Y., ELIZAUR, A., PARK, M., FISCHER, H., CRAIG, G., RIVER, E., LOVEJOY, A. and N. SHERWOOD. (1994). Three forms of gonadotropin - releasing hormone characterized from the brain of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 12081-12085.
- RIAZI, A. and L. FREMONT. (1988). Serum vitellogenin and yolk proteolipid complex composition in relation to ovarian growth in rainbow trout *Salmo gairdneri*, (RICH). *Comp. Biochem. Physiol.*; 89B: 525-529
- RODRIGUEZ, 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.
- RODRIGUEZ, J., A. BANDA, L. GONZALEZ, J.HERRERA y F. GARCIA (1998). Evaluación biológico-pesquera del catán (*Atractosteus spatula*) en la presa Vicente Guerrero. V Congreso Nacional de Ictiología, Tuxpan, Ver. pp182-183.
- RODRIGUEZ, N. J., BON, E. and F. LE MENN. (1996). Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.*, 274: 163-170.
- SCHAFHAUSER-SMITH, D. and BENFEY, T. J. (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.

- 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.
- SILVERSTEIN, T., BOSWORTH, G. and 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.
- SPECKER, J. L. and C. V. SULLIANG.** (1994). Vitellogenesis in fish: status and perspectives. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. 304-315.
- SUTTKUS, R. D.** (1963). Order Lepisosteii, in fishes of the Western North Atlantic. *Mem. Sears. Foundation Mar. Res.*; 1(3): 630 pp.
- TAKEMURA, A. and M. OKA.** (1998). Immunochemical sexing of living yellowfin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin-like protein. *Aquacul. Res.*, 29: 245-249.
- TAKEMURA, A., HARA, A. and K. TAKANO.** (1991). Immunochemical identification and partial characterization of female-specific serum proteins in white-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii*. *Environmental Biology of Fishes.*, 30: 49-56.
- TAKEMURA, A. and K. TERUGA.** (1997). Purification and partial characterization of the vitellogenin of coral trout, *Plectropomus leopardus*. *Bulletin of Marine Science.*, 61 (3): 791-800.
- TYLER, CH. R.; J. P. SUMPTER and N. R. BROMAGE.** (1988). *In vivo* ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.*; 246: 171-179.
- TYLER, CH. R. and J. P. SUMPTER.** (1990). The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry.*, 8: 111-120.
- TYLER, C. R. and P. LANCASTER.** (1993). Isolation and characterization of the receptor for vitellogenin from follicles of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Comp. Physiol B.*, 163: 225-233.
- VAITUKAITIS, L., J.** (1981). Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. *Methods in Enzymologist.*, 73: 46-52.

- VERRETH, J. A. J., M. CARRILLO, S. ZANUY and E. A. HUISMAN.** (1987). Aquaculture research in Latin America. *The Latin American seminar on Aquaculture*, International Foundation for Science, Stockholm, Sweden, in Lima, Peru., 45-77.
- WAAGBOE, R. and K. SANDNES.** (1988). Determination of vitellogenin in serum of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography.*, 427: 138-143.
- WALLACE, R. S. WALKER and P. Hauschka** (1967). Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high density lipoprotein from the eggs of decapods. *Biochemistry.* 6:1582-1590.
- WATTS, M., PANKHURST, N., PRYCE, A. and B. SUN.** (2003). Vitellogenin isolation, purification and antigenic cross-reactivity in three teleost species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 134B (3): 467-476.
- WILEY, R., OPRESKO, L. and R. A. WALLACE.** (1979). New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. *Analytical Biochemistry.* 97: 145-152.
- YAO, Z. and L.W. CRIM.** (1996). A biochemical characterization of vitellogenins isolated from the marine fish, ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113 B (2): 247-253.
- ZANUY, S. y M. CARRILLO.** (1987). La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. *Reproducción en Acuicultura.*, 1-56.

