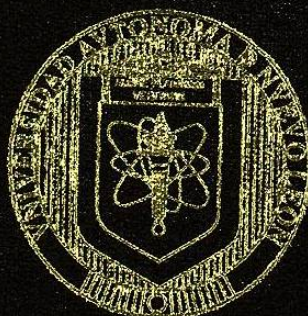


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LOS LEPISTOSTEIDOS

ESTUDIO DE LA VITELÓGENESIS SECUNDARIA

TESIS

QUE PRESENTA:

Q.B.P. SUSANA VELA VALLADARES

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

MONTERREY, N. L.

NOVIEMBRE DEL 2003

TM

Z5320

FCB

2003

.V44

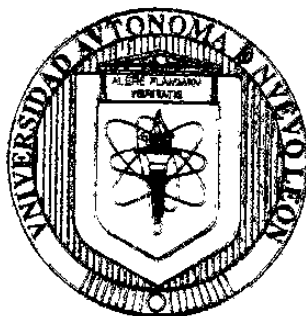


1020149285

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LOS LEPISOSTEIDOS:
ESTUDIO DE LA VITELÓGENESIS SECUNDARIA**

T E S I S

QUE PRESENTA:

Q.B.P. SUSANA VELA VALLADARES

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

MONTERREY, N. L.

NOVIEMBRE DEL 2003

974197

TH

Z5320

FEB

2003

.V44



FONDO
TESIS

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

FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LOS LEPISOSTEIDOS: ESTUDIO DE LA
VITELOGENESIS SECUNDARIA

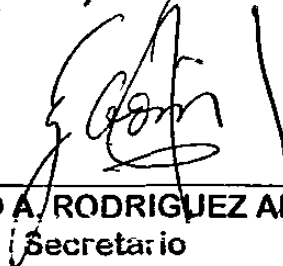
TESIS
QUE PRESENTA
Q.B.P SUSANA VELA VALLADARES

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

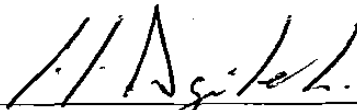
COMISION DE TESIS



DR. ROBERTO MENDOZA ALFARO
Director de Tesis



M.C. GABINO A. RODRIGUEZ ALMARAZ
Secretario



DR. CARLOS J. AGUILERA GONZÁLEZ
Vocal

INDICE

INDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
III.- HIPÓTESIS	3
IV.- IMPORTANCIA	3
V.- ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN	4
VI.- ANTECEDENTES	4
VI.1.- Aspectos reproductivos de los Lepisosteidos.....	4
a) <i>Anatomía interna</i>	4
b) <i>Dimorfismo sexual</i>	5
c) <i>Proporción sexual utilizada para la reproducción</i>	6
d) <i>Comportamiento reproductivo</i>	7
e) <i>Temporada de reproducción</i>	8
f) <i>Fecundidad</i>	9
g) <i>Eclosión</i>	9
VI.2.- Etapas de la reproducción.....	9
a) <i>Ovogénesis</i>	9
b) <i>Vitelogénesis</i>	11
c) <i>Características de la molécula de Vitelogenina</i>	12
d) <i>Maduración</i>	15
e) <i>Ovulación</i>	16
VI.3.- Evaluación de la madurez gonádica de hembras.....	16
a) <i>La punción abdominal</i>	17
b) <i>El empleo del endoscopio</i>	17
c) <i>El monitoreo ovárico por canulación</i>	17
VI.4.- Purificación de Lipovitelina y Vitelogenina.....	18
a) <i>Ultracentrifugación</i>	19
b) <i>Precipitación</i>	19
c) <i>Cromatografía de Exclusión Molecular</i>	19
d) <i>Cromatografía de Intercambio Iónico</i>	20
VI.5.- Caracterización de VTG.....	20
a) <i>Determinación de Lípidos</i>	20
b) <i>Detección de Fósforo</i>	20
a) <i>Determinación de carbohidratos</i>	21
b) <i>Detección de Carotenoides</i>	21
c) <i>Electroforesis</i>	21
VII.- METODOLOGÍA	22
VII.1.- Material biológico.....	22
VII.2.- Inducción con 17 β -estradiol.....	22
VII.3.- Extracción de muestras de gónadas.....	23
VII.4.- Purificación de la VTG y VTL.....	23
a) <i>Preparación del extracto de ovario</i>	23

b) Preparación de muestras de sangre.....	24
c) Precipitación con EDTA-MgCl ₂	24
d) Cromatografía de Filtración en gel.....	24
e) Cromatografía de Intercambio Iónico.....	25
VII.5.- Caracterización de la VTG y VTL.....	25
a) Determinación de Lípidos.....	25
b) Determinación de Carotenoides.....	25
c) Determinación de Fósforo.....	26
d) Determinación de Carbohidratos.....	26
e) Determinación del Peso Molecular.....	26
VIII.- RESULTADOS.....	27
VIII.1.- Purificación de VTG y VTL.....	27
a) Cromatografía de Filtración en gel de Sepharosa-6B.....	27
b) Cromatografía de Intercambio Iónico.....	31
VIII.2.- Caracterización de la VTG y VTL.....	32
a) Determinación de Lípidos.....	32
b) Determinación de Carotenoides.....	33
c) Determinación de Fósforo.....	35
d) Determinación de Carbohidratos.....	36
e) Determinación del Peso Molecular.....	37
IX.- DISCUSIÓN.....	40
IX.1.- Evaluación gonádica de hembras.....	40
IX.2.- Inducción con 17B-estradiol.....	41
IX.3.- Purificación de la VTG y VTL.....	42
IX.4.- Caracterización de la VTG y VTL.....	46
IX.5.- Determinación del Peso Molecular.....	48
X.- CONCLUSIÓN.....	50
XI.- LITERATURA.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Pesos moleculares de Vitelogenina nativa y subunidades de diferentes especies de peces.....	12
Tabla 2.	Composición química porcentual de la VTG en diferentes especies de peces.....	13
Tabla 3.	Diferentes técnicas aplicadas para la purificación y caracterización de la Vitelogenina en diferentes especies.....	18
Tabla 4.	Modelo de inducción con 17B-Estradiol en ejemplares de pejelagarto machos..	23
Tabla 5.	Valores obtenidos en el análisis de regresión lineal para la determinación del peso molecular de la VTG y VTL.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Simplificación del sistema de retroalimentación entre el ovario e hígado durante la vitelogénesis exógena.....	15
Figura 2.	Perfil de una muestra de plasma de macho control durante las 4 semanas.....	27
Figura 3.	Perfil de una muestra de plasma de macho durante las 4 semanas de inducción con 17B-Estradiol	28
Figura 4.	Comparación de los cromatogramas de las muestras de plasma de machos inducidos con 17B-Estradiol de la 4ª. semana con los plasmas de los machos control	29
Figura 5.	Cromatograma obtenido de una muestra de plasma de macho inducido con 17B-Estradiol de la 4ª. semana precipitado con EDTA y MgCl ₂	30
Figura 6.	Cromatograma obtenido de un extracto de gónada de hembra madura precipitado con EDTA y MgCl ₂	30
Figura 7.	Comparación de los cromatogramas obtenidos de las diferentes muestras procesadas por Filtración en gel	31
Figura 8.	Muestras de plasma de macho inducido con 17B-Estradiol de la 4ª. semana y de un extracto de gónada de hembra madura después de someterlos a Cromatografía de Intercambio Iónico (DEAE-Sephacel) eludías con un gradiente lineal de KCl 0.5M.....	32
Figura 9.	Contenido de lípidos presente en las fracciones de una muestra de plasma de macho inducido con 17B-Estradiol de la 4ª. semana, determinados mediante la técnica de Negro Sudan B	33
Figura 10.	Barrido de un extracto de gónada de hembra madura de pejelagarto en un rango de longitud de onda entre 260 y 700 nm	34
Figura 11.	Determinación de los carotenoides presentes en una muestra de plasma de macho inducido con 17B-Estradiol de la 4ª. semana	35
Figura 12.	Determinación del fósforo presente en una muestra de plasma de macho	

inducido con 17 β -Estradiol de la 4 ^a . semana mediante una modificación del método de Fiske-Subbarow, 1925.....	36
Figura 13. Determinación de los carbohidratos presentes en una muestra de plasma de macho inducido con 17 β -Estradiol de la 4 ^a . semana mediante la técnica de la <i>o</i> - Toluidina.....	37
Figura 14. Perfiles de elusión en gel SDS-PAGE al 6%.....	38
Figura 15. Estimación del peso molecular de la VTG y VTL mediante el análisis de regresión lineal de los valores de R _f obtenidos por Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).....	39

RESUMEN

El catán (*Atractosteus spatula*) está considerada como la especie dulceacuícola de mayor tamaño que habita en las aguas continentales de México. En los estados de Tamaulipas y Nuevo León y Veracruz cuenta con un mercado bien establecido, por lo que han sido objeto de una intensa pesca artesanal, además estos peces también son objeto de pesca deportiva debido a que su gran tamaño los convierte en un atractivo trofeo. Sin embargo, en la actualidad no existen normas que regulen su captura, lo cual ha provocado una explotación desmedida, esto aunado a las alteraciones de su hábitat han provocado que los volúmenes de su captura decrezcan de manera marcada, lo que implica no solo la privación de un recurso tradicional para los pescadores y comerciantes de la región Noreste, sino también el riesgo de que la especie se extinga. Hasta el momento no se ha ejercido ningún tipo de control sobre su reproducción, lo que ha originado que su temporada de reproducción y desove se restrinja solo durante una semana en el año, lo que limita enormemente la producción de crías necesarias para restaurar los niveles poblacionales de la especie y mantener la pesquería. La solución inmediata radica en el desarrollo de técnicas dirigidas hacia el control de la reproducción en cautiverio, como medida para recuperar las poblaciones amenazadas. El objetivo de este estudio es la purificación y caracterización de la Vitelogenina plasmática (VTG) y Lipovitelina ovárica (VTL) del pejelagarto (*A. tropicus*) con la finalidad de obtener una referencia para la purificación de estas moléculas en *A. spatula* y de esta manera establecer un inmunoensayo que nos permita diferenciar el sexo de los organismos y evaluar su madurez sexual. 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 Sepharosa- 6B, y posteriormente separando las moléculas mediante Cromatografía de Intercambio Iónico con DEAE-Sepharcel. La caracterización de las moléculas se llevó a cabo mediante la identificación de sus grupos prostéticos. Finalmente se determinó el peso molecular utilizando la técnica de Electroforesis SDS-PAGE, resultando de 195.2 kDa. Para la VTG y de 192.9 kDa. Para la VTL. De este estudio se deriva la importancia de la molécula de VTG como un marcador bioquímico para la estimación del grado de madurez sexual, así como la determinación del sexo en ejemplares adultos.

FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LOS LEPISOSTEIDOS: ESTUDIO DE LA VITELOGENESIS SECUNDARIA.

I.-INTRODUCCION

Los Lepisosteidos son sobrevivientes de un grupo ancestral y primitivo de peces que vivió y floreció durante el Triásico, antes que la mayoría de los peces modernos. 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.*, 2000a). En la actualidad se encuentran distribuidos desde los Estados Unidos de Norteamérica hasta Centroamérica (Costa Rica y Nicaragua) (Alvarez, 1970). En México se localizan a lo largo de la vertiente del Océano Atlántico (Morales, 1987).

Habitan en cuerpos de agua dulce, preferentemente donde existe abundante vegetación acuática sumergida y dentro de este grupo el catán (*Atractosteus spatula*) es la especie más resistente a la salinidad (Colunga, 1996), por lo cual no es raro encontrarlo en aguas salobres e inclusive saladas. (Suttkus, 1963).

El catán es una especie con gran atractivo comercial en la zona Noreste del país, la cual ha venido sufriendo un fuerte impacto en sus poblaciones. Al analizar las estadísticas de captura, para Tamaulipas, se observa una gran fluctuación en los registros de su comercialización, los cuales muestran una tendencia negativa en los últimos diez años. Así, mientras la captura significó 13.245 toneladas para 1988, ésta disminuyó considerablemente durante 1990 a 5.750 toneladas, incrementándose nuevamente hacia 1995 a 45.237 toneladas, mismas que disminuyeron al máximo para 1997 a solo 1.144 toneladas. (Estadística pesquera CRIP-Tampico), (Ortiz, 1998).

El pejelagarto (*A. tropicus*) es un pez que habita en las áreas pantanosas del sureste de México; la especie se localiza en el sur de Veracruz, Campeche, Chiapas y Tabasco, aunque su distribución se extiende en Centroamérica hasta Costa Rica (Espinosa *et al.*, 1993). Debido a que sus hábitos alimenticios son carnívoros, el pejelagarto es de gran importancia ecológica al jugar el papel primordial como regulador de las poblaciones de peces y anfibios de las zonas

pantanosas. Como recurso alimenticio tiene gran demanda en el mercado de la región, ya que es apreciado en la preparación de platillos tradicionales y en la elaboración de artesanías. Asimismo, tiene un potencial importante como especie de ornato. Esto ha originado que las poblaciones silvestres de *A. tropicus* estén siendo sometidas a una intensa presión de captura, como lo demuestra la abundancia de ejemplares pequeños que se exhiben en los mercados locales durante los últimos años. Si bien, los ejemplares cumplen con la talla mínima de captura, cabe señalar que se pesca todo el año y que los mayores volúmenes se presentan en la temporada de desove, debido a que su comportamiento reproductivo propicia que sea en esta época cuando ocurren concentraciones masivas de esta especie.

Estos peces son apreciados por la calidad de su carne, comercializándose en forma de chicharrón (Rosas, 1976) o ahumado (Rodríguez de la Cruz, *et al.*, 1994). Al mismo tiempo en algunas ciudades de los Estados Unidos de Norteamérica tienen importancia dentro de la pesca deportiva (Morales, 1987), ya que son considerados como una de las especies dulceacuícolas más grandes del mundo (Sttukus, 1963).

Hasta el momento no se ha ejercido ningún tipo de control sobre la reproducción del catán y únicamente se cuenta con 40 adultos mantenidos en cautiverio en el Centro Acuícola Tancol (SAGARPA), los cuales 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 y mantener la pesquería. Debido a esta situación y tomando en cuenta que los escasos ejemplares adultos existentes son considerados como Patrimonio de la Nación, resulta difícil realizar estudios directos con estos organismos, de ahí que se requiera un modelo lo más cercano posible a esta especie con el fin de experimentar diversas técnicas de inducción de la reproducción. Por lo anterior, en este trabajo se ha recurrido a la utilización de una especie cercana, el pejelagarto para realizar los estudios de base y de esta manera tomar los resultados como referencia para su aplicación en ejemplares de catán.

II.- OBJETIVO GENERAL

Establecer los protocolos de purificación y caracterización de la Vitelogenina plasmática (VTG) y Lipovitelina ovárica (VTL) del pejelagarto (*A. tropicus*) con la finalidad de obtener una referencia para la purificación de estas moléculas en *A. spatula* y de esta manera establecer un inmunoensayo que nos permita diferenciar el sexo de los organismos y evaluar su madurez sexual.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Purificación de la Vitelogenina plasmática (VTG) y Lipovitelina ovárica (VTL) del pejelagarto.
2. Caracterización de la VTG y la VTL en base a sus grupos prostéticos.

III.- HIPOTESIS

Si la VTG y la VTL son moléculas que se encuentran exclusivamente en hembras en edad reproductiva, entonces será posible aislarlas, purificarlas y caracterizarlas en hembras de *A. tropicus* con la finalidad de establecer estos protocolos en el caso de *A. spatula*.

IV.- IMPORTANCIA

Debido a que en México el catán (*Atractosteus spatula*) tiene una considerable importancia no solo económica, sino tradicional como alimento en la zona Noreste del país, su estudio resulta esencial en virtud de que al analizar los registros de su captura en el estado de Tamaulipas, se observa un marcado descenso durante los últimos diez años.

Esta gran disminución en los niveles poblacionales del catán implica, sin lugar a dudas, el riesgo de que la especie se extinga; de ahí la necesidad de implementar técnicas que puedan ser

utilizadas para el control de su reproducción con miras a incrementar las futuras producciones de juveniles que se destinarán a restaurar las poblaciones de esta especie.

V.- ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION

Hasta el momento, los trabajos que se han realizado en relación a la reproducción de *A. spatula* son incipientes y se han limitado únicamente al mantenimiento de reproductores en cautiverio. Por lo que se pretende ejercer un mayor control sobre la reproducción, ya que actualmente la temporada de reproducción natural se restringe a una sola semana en el año, lo cual evidentemente representa un cuello de botella para la obtención de crías, por lo que al utilizar a *A. tropicus* como modelo tenemos la ventaja de tener una mayor disponibilidad de organismos, además de contar con la experiencia en su manejo zootécnico, aunado a que la temporada de su reproducción es más extendida, y principalmente que mantiene una relación filogenética muy estrecha con *A. spatula*.

VI.- ANTECEDENTES

VII.- ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LOS LEPISOSTEIDOS.

En la actualidad, se conoce muy poco acerca de los hábitos reproductivos de los Lepisosteidos (Breder y Rosen, 1996), únicamente se cuenta con las observaciones aisladas en el medio natural por algunos autores estadounidenses y mexicanos.

Tomando en cuenta lo anterior, a continuación se presentan algunos aspectos de la biología reproductiva de estas especies.

a) Anatomía interna

Tanto en machos como en hembras, las gónadas se localizan en la región posterior de la cavidad abdominal, en posición dorsal con respecto a la vejiga natatoria, suspendidas por un mesorquio (Pérez-Sánchez y Páramo, 1998). Las gónadas de las hembras se encuentran

desfasadas: la derecha se sitúa de manera anterior a las aletas pélvicas, mientras que la izquierda se localiza posterior a éstas (Suttkus, 1963).

Los ovarios son pequeños y translúcidos en estadios tempranos, pero al avanzar la maduración se vuelven fusiformes y su color va cambiando de acuerdo a la fase de desarrollo en que se encuentran. Así, los ovarios de hembras jóvenes adquieren una coloración rosa-amarillento correspondiente al color de los ovocitos, mientras que en las etapas más avanzadas de la maduración predomina el color verde olivo o verde grisáceo (Resendez y Salvadores, 1983; Pérez-Sánchez, 1995). De aquí, que justo antes del desove los huevos se toman de color verde (Netch y Witt, 1962). Los ovocitos una vez maduros tienen un diámetro de 3 mm. (variable según la especie) y están cubiertos de una sustancia adhesiva. Bejerano *et al.* (1997) mencionan que la maduración se desarrolla de manera sincrónica en todas las regiones del ovario.

Por otra parte, los testículos de los machos son blancuzcos y de menor tamaño que los ovarios. Son de tipo lobular, y el proceso de espermatogénesis ocurre igualmente de manera sincrónica. A medida que ocurre la maduración, los testículos varían de tamaño y color, siendo pequeños, amarillos y translúcidos cuando son inmaduros y grandes, blancos y de apariencia cremosa cuando están completamente maduros (Pérez-Sánchez y Páramo, 1998).

b) Dimorfismo sexual

Los machos no solo maduran a una menor talla que las hembras, sino que crecen menos que estas (Suttkus, 1963).

Las hembras lucen un vientre muy inflamado debido al crecimiento de las gónadas e igualmente presentan una papila genital más inflamada y más coloreada que el macho (León *et al.*, 1978). No obstante, al tratarse de peces inmaduros, éstos resultan muy difíciles de sexar.

Es necesario que las gónadas se encuentren algo desarrolladas, ya que el mayor tamaño y forma oval de los ovarios permite diferenciar a las hembras de los machos (Netch y Witt, 1962). Sin embargo, en el caso de diferentes especies de lepisosteidos, esto solo es posible después de varios años. Y aún en lepisosteidos que maduran relativamente rápido como es el caso del pejelagarto, se tiene cierta dificultad para encontrar diferencias entre hembras y machos (Chávez-lomelí,

1980). A este respecto, se han propuesto modelos alométricos como una herramienta para el sexado de esta especie (Contreras y Marañón, 1991 citado por Mendoza *et al.*, 2000a).

En condiciones de cautiverio machos y hembras maduros son prácticamente imposibles de distinguir (G. Marquez comunicación personal).

Resulta aún más difícil evaluar el grado de madurez sexual de las hembras, ya que por el momento no existen métodos rápidos y precisos para ello (Bejerano *et al.*, 1997), debido a que sus gónadas presentan una condición ginoaria, es decir, sus gónadas se encuentran desfasadas y los óvulos no pasan directamente del ovario al poro genital, por lo que los oviductos se reúnen en los ductos urinarios formando una pequeña cámara, de esta manera los productos de ambos salen a través de un sinus urogenital único. (Suttkus, 1963).

c) Proporción sexual utilizada para la reproducción

Los catanes alcanzan la madurez sexual alrededor de los 3 a 4 años en el caso de los machos y de 6 años en las hembras (Netch & Witt, 1962).

Estos peces presentan un comportamiento poco gregario; sin embargo, durante la temporada de reproducción se les encuentra comúnmente formando grupos de decenas de individuos, habiéndose observado en algunas ocasiones hasta más de 20 ejemplares al mismo tiempo (Alemán, 1987; Deán, 1895; Holloway, 1954). Las hembras encabezan estos grupos, mientras que los machos avanzan detrás de ellas expulsando el esperma que fecundará los óvulos (Contreras, 1987).

Generalmente, se observa un mayor número de machos que de hembras. Suttkus, (1963) menciona que cuando las hembras están próximas a desovar se hacen acompañar de uno a cuatro machos. En el caso del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) se han reportado relaciones macho:hembra que van desde 0.82:1 (Chávez-Lomelí, 1989), pasando por proporciones de 1:1.2 (Resendez y Salvadores, 1983), 3:1 (Bejerano *et al.*, 1997), hasta proporciones de 5:1 (Gomez-Gomez, 1989; Pérez-Sánchez, 1995).

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

d) Comportamiento reproductivo

El comportamiento reproductivo para *Lepisosteidos spp.* descrito por Dean (1895) en Black Lake, Carolina del Sur, indica que primeramente se les percibe en las regiones profundas del lago y posteriormente se les puede apreciar cerca de la orilla. Menciona que es común ver cardúmenes de 20 o más ejemplares en la proximidad de las regiones de menor profundidad, en las cuales desovan. Al aproximarse a la orilla los cardúmenes se separan por grupos. Cada hembra se hace acompañar de 2 a 8 machos, los cuales nadan unos cerca de otros. El hocico de los machos, que se presenta de un color más claro que lo normal, probablemente debido a la temporada de reproducción, presiona la región abdominal de la hembra, para de esta manera incitarla a expulsar los huevecillos. En ese momento nadan con las aletas extendidas, y particularmente las aletas dorsales y anales se encuentran erectas, de tal forma que estas últimas junto con la aleta caudal pueden percibirse desde lejos, mientras se adentran en aguas poco profundas.

Posteriormente, se presenta un lapso de quietud, el cual es seguido por movimientos hacia adelante, hacia atrás y en círculos, cerca de la orilla, y minutos más tarde se presentan movimientos bruscos. En ese momento los huevecillos son expulsados y fertilizados, pudiéndose apreciar nubes de esperma en el agua. Enseguida se presenta un período de calma durante varios minutos, para después continuar con una segunda ovoposición. El desove por lo general se presenta entre las 19:30 y 20:30 horas. No todos los huevecillos son depositados por la hembra durante un solo día. Los desoves en el caso del pejelagarto (Pérez-Sánchez, 1995) y del catán (Morales, 1987) ocurren durante la noche, llegando a prolongarse hasta el día siguiente. Después del evento reproductivo, los individuos reunidos en las áreas de desove se dispersan de inmediato a otras áreas (Suttkus, 1963). Un comportamiento similar ha sido descrito por Morales (1987) en el caso de la reproducción en condiciones de cautiverio del catán (*Atractosteus spatula*). Sin

embargo, cabe mencionar que después de que los óvulos han sido fecundados, es necesario sacar a los machos del estanque para evitar que se coman los huevecillos.

e) Temporada de reproducción

Típicamente los lepisosteidos desovan durante la primavera y principios del verano (Simon y Wallus, 1989). Así, el desove tiene lugar de manera intermitente, considerándose solamente de 6 a 7 días efectivos durante la temporada (Dean, 1895).

Uno de los casos más documentados es el del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) que habita en el Río San Pedro, en el que se menciona que de Marzo a Octubre gran parte de la población de machos y hembras se encuentran en estado de madurez sexual avanzado. Asimismo, se han logrado localizar de manera aislada ejemplares maduros en Diciembre y Febrero, lo cual sugiere un potencial reproductivo permanente, con un período de reproducción más intenso durante los meses de Abril a Septiembre (Chávez-Lomelí *et al.*, 1989). Este dato coincide con las observaciones realizadas por Gómez-Gómez (1989) quien señala que la temporada de desove inicia en Mayo y finaliza en Septiembre. Por otra parte, Resendez y Salvadores (1983) dan a conocer que la maduración gonádica de esta especie inicia en Abril, y ya para el mes de Junio se aprecian organismos maduros, listos para desovar en Agosto y Septiembre. De acuerdo a lo anterior, Pérez-Sánchez (1995) señala que la temporada reproductiva de esta especie es de Junio a Agosto.

Se cree que el pico de desoves se sitúa en el mes de Mayo y es precedido por una elevación en la temperatura del agua. Un dato importante que viene a confirmar la suposición anterior, es el emitido por Morales (1987), para el caso de los catanes (*Atractosteus spatula*), quien describe que estos organismos desovan cuando la temperatura promedio del agua se eleva por encima de los 27°C, misma que se alcanza en los meses de Mayo a Julio en la parte sur de Tamaulipas. De acuerdo a Dean (1895), la temperatura del agua es el factor más determinante sobre la temporada de desove.

f) Fecundidad

De manera general, la fecundidad de los lepisosteidos es elevada, y el número de huevecillos aumenta con la talla de la hembra (Halloway, 1954). Para el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) se reporta una fecundidad promedio de 12,958 huevecillos por kg de peso para una hembra de una talla de 64.5 cm (Chávez-Lomelí *et al.*, 1989). En contraste con estas observaciones, Mendoza *et al.* (1993) reportan para la misma especie fecundidades de 8,787 ovocitos por kg. de peso. Mientras que Morales (1987) menciona que las hembras de catán (*Atractosteus spatula*) desovan en promedio 4,000 huevecillos por kg. de peso, mismos que podrían ser reabsorbidos por las hembras en caso de no encontrar las condiciones adecuadas para el desove.

g) Eclosión

El período de incubación hasta llegar a la eclosión es igualmente variable. Para el caso del pejelagarto, se ha estimado que un 75% de los huevos eclosionan a las 48 horas de incubación cuando la temperatura del agua es de 30°C y que las unidades de temperatura celcius (UTC) necesarias para alcanzar el 80% de eclosión esta dada por la relación $UTC = 216.7 - 5.3 * Temp.$ (Márquez, 1998). Mientras que en el caso del catán el período de incubación va desde las 50 a 62 horas, con un promedio de 57 horas a 27°C (Morales, 1987).

VI.2.- ETAPAS DE LA REPRODUCCION.

a) Ovogénesis.

El ovario o gónada femenina en los peces se origina a partir de repliegues peritoneales en los cuales están inmersas las células más primitivas de la estirpe del ovocito: las ovogonias. Estos repliegues son conocidos como pliegues ovígeros (Benítez, 1992; Zanuy & Carrillo, 1987), los cuales a su vez están rodeados por una cubierta conjuntiva que se denomina *túnica albugínea* (Verreth, *et al.*; 1987). El ovario es hueco y el lumen se encuentra revestido por epitelio germinal.

Dentro de esta estructura se encuentran las ovogonias, que están inmersas en la pared conjuntiva de los pliegues ovígeros, formando el estroma ovárico, el cual contiene vasos sanguíneos y células somáticas (las foliculares y tecales) que se asocian al desarrollo del ovocito.

Las ovogonias son células pequeñas de citoplasma de color claro que pueden encontrarse aisladas o formando cúmulos (Benítez, 1992) y tienen la capacidad de convertirse en ovocitos durante toda la vida de la hembra. (Zanuy & Carrillo, 1987; Benítez, 1992).

Esto se logra una vez que las ovogonias entran en la profase de la primera división meiótica, convirtiéndose de esta manera en ovocitos primarios (Zanuy & Carrillo, 1987), los cuales posteriormente se encontrarán rodeados de células foliculares, constituyendo la unidad estructural que se conoce como folículo. (Benítez, 1992). Los ovocitos se caracterizan por presentar un citoplasma basófilo que aumenta de volumen debido a la acumulación de sustancias morfogenéticamente importantes diferentes del vitelo; durante esta fase, conocida como *previtelogénesis*, se produce el primer crecimiento del ovocito.

Conforme el ovocito continúa su crecimiento aparecen cuerpos esféricos en su citoplasma llamados *vesículas vitelínicas* compuestas básicamente por mucopolisacáridos (Benítez, 1992), que pronto se hacen abundantes, ocupando prácticamente todo el citoplasma, lo que propicia un segundo aumento en su tamaño. Durante esta fase el ovocito ya se encuentra rodeado por una capa de células foliculares (*la granulosa*) y tecales separadas por una membrana basal (Verreth, *et al.*; 1987). Al mismo tiempo se inicia el depósito del material que constituye la membrana vitelínica o corion, el cual se sitúa entre el ovocito y las células foliculares. (Benítez, 1992).

En la teca hay células especiales cuya función secretora de hormonas ha sido objeto de polémica. Sin embargo, se ha detectado actividad esteroideogénica en estas células y en las de la granulosa. Así, se ha demostrado que el ovario es capaz de sintetizar corticosteroides, andrógenos y estrógenos (17β -estradiol), importantes para la Vitelogénesis, así como progestágenos: dihidroxiprogesterona ($17\alpha 20\beta$ -diOHP), importantes para la maduración de los ovocitos. (Verreth, *et al.*; 1987).

Posteriormente a la acumulación de vesículas vitelínicas en el citoplasma del ovocito, comienzan a aparecer los primeros gránulos de vitelo, con los que se inicia una impresionante fase de crecimiento. (Benitez, 1992; Zanuy & Carrillo, 1987).

b) Vitelogénesis.

Durante los meses anteriores a la ovoposición, se produce un crecimiento drástico del ovario (Benitez, 1992; Zanuy & Carrillo, 1987) debido al cúmulo de grandes reservas nutritivas o vitelo por parte de los ovocitos. La síntesis de vitelo recibe el nombre de *Vitelogénesis*.

Los eventos descritos desde el inicio de la formación de los folículos en Vitelogénesis ocurren mientras el núcleo del ovocito ha estado detenido en la fase de diploteno de la meiosis I. Durante estas fases, la vesícula germinativa o núcleo conserva una posición central.

La síntesis de vitelo ocurre tanto dentro del ovocito (*Vitelogénesis Endógena*) como fuera de este (*Vitelogénesis Exógena*) (Ho, 1987; Zanuy & Carrillo, 1987). De manera general, la Vitelogénesis Endógena precede a la exógena, sin embargo, en ocasiones dichas fases se superponen entre sí. (Mommsen & Walsh, 1988).

El vitelo endógeno o intravesicular reside en la formación de *vesículas vitelínicas*, las cuales son precursoras de los alveolos corticales, estructuras que liberan su contenido en el espacio previtelínico en el momento de la fecundación del ovocito. (Zanuy & Carrillo, 1987).

Por otra parte, la incorporación de vitelo exógeno (Vitelogénesis Exógena) inicia con la internalización de un precursor plasmático: la Vitelogenina (VTG). (Ng & Idler, 1983), de manera que se forman los *gránulos de vitelo*, los cuales a medida que van migrando hacia el interior del ooplasma, desplazan a las vesículas vitelínicas hacia la periferia.

La Vitelogenina es sintetizada en el hígado, bajo la estimulación de estrógenos producidos en el ovario, posteriormente es secretada a la circulación y transportada al ovario, en donde es incorporada dentro de los ovocitos por un proceso de micropinocitosis mediado por receptores. (Ng & Idler, 1983; Ho, 1987; Mommsen & Walsh, 1988; Zanuy & Carrillo, 1987).

La VTG, tan pronto es captada por el ovocito, es disociada proteolíticamente en sus componentes: VTL y Fosvitina (Zanuy & Carrillo, 1987). Al final de la Vitelogénesis, la vesícula germinativa (núcleo) del ovocito migra hacia la periferia para posteriormente completar la meiosis, proceso que se conoce como *maduración ovocitaria*.

c) Características de la molécula de Vitelogenina.

La Vitelogenina plasmática (VTG) ha sido químicamente definida como una lipoglicofosfocarotenoproteína específica de hembras en estado reproductivo (Norberg y Haux, 1988; Kanungo *et al*; 1990; Lancaster & Tyler, 1994; Mañanós *et al*; 1994; Specker & Sulliang, 1994; Lafleur, *et al*; 1995), similar a las de otros vertebrados (Mommsen & Walsh, 1988). Esta molécula posee un alto peso molecular debido a su asociación con lípidos, residuos de carbohidratos, fósforo, calcio y hierro (Hori *et al*; 1979; De Vlaming *et al.*, 1980; Ho, 1987; Riazi & Fremont, 1988; Waagboe & Sandnes, 1988; Campbell & Idler, 1990; Tyler & Sumpter, 1990; Matsubara & Sawano, 1995; Komatsu *et al*; 1996; Nuñez, *et al*; 1996; Rodríguez *et al*; 1996). Se ha reportado un rango de pesos moleculares para la VTG de algunos teleósteos que van de los 326,000 a los 550,000 kDa. (Tabla 1).

Tabla 1. Pesos moleculares de Vitelogenina nativa y subunidades de diferentes especies de peces.

ESPECIE	masa VTG (kDa)	masa Sub (kDa)	METODO	AUTOR	AÑO
Anguilla japonica		85	Gel filtración, SDS-PAGE	Hara, <i>et al.</i>	1,980
Carassius auratus	326	140-156	SDS-PAGE	Hori, <i>et al.</i>	1,979
Fundulus heteroclitus	-	200	SDS-PAGE	Selman & Wallace	1983a
Gadus morhua	400	-	Gel filtración	Plack, <i>et al.</i>	1,971
Heteropneustes fossilis	550	-	Gel filtración	Nath & Sundararaj	1,981
Oncorhynchus kisutch	390	-	Gel filtración	Markert & Vanstone	1,971
Platichthys flesus	550	-	Gel filtración	Korsgaard, <i>et al.</i>	1,976
Salmo gairdneri	342	-	Ultracentrifugación	Campbell & Idler	1,980
Salmo gairdneri	440	-	Gel filtración	Campbell & Idler	1,980
Salmo gairdneri	440	-	Gel filtración	Norberg & Haux	1,985
Salmo gairdneri	470	-	Gradiente PAGE	Campbell & Idler	1,980

<i>Salmo gairdneri</i>	-	170	Gradiente PAGE	Chen	1,983
<i>Salmo gairdneri</i>	-	200	SDS-PAGE	Valotaire, <i>et al.</i>	1,984
<i>Salmo gairdneri</i>	500	-	Gel filtración, SDS-PAGE	Sumpter	1,981
<i>Salmo gairdneri</i>	535	16-103	SDS-PAGE	Maitre, <i>et al.</i>	1985a
<i>Salmo gairdneri</i>	350	220	Gel filtración, SDS-PAGE	Hara & Hirai	1,978
<i>Salmo salar</i>	495-520	-	Gel filtración	So, <i>et al.</i>	1,985
<i>Salmo trutta</i>	440	-	Gel filtración	Norberg & Haux	1,985

Al igual que el peso molecular, las concentraciones de los componentes químicos varían dependiendo de las especies (Tabla 2) y de la etapa de maduración en que se encuentren, tal es el caso de *Dicentrarchus labrax* y *Acipenser baeri*, ya que ambos presentan niveles elevados de VTG aproximadamente de 3 mg/mL y 100 mg/mL, respectivamente algunos meses antes de que se lleve a cabo el desove y estos niveles disminuyen hasta 1 mg/mL en *Dicentrarchus labrax* y 10 mg/mL en *Acipenser baeri* durante el desove y unos días posteriores a este (Cuissiet *et al.*, 1991; Mañanós *et al.*, 1994).

Tabla 2. Composición química porcentual de la VTG en diferentes especies de peces.

ESPECIE	PROTEINA %	LIPIDOS %	FOSFORO %	CARBOHIDRATOS %	AUTOR	AÑO
<i>Anguilla japonica</i>	86.0	13.0	---	1.0	Komatsu, <i>et al.</i>	1,996
<i>Macrozoarces americanus</i>	---	18.0	3.6	---	Yao & Crim	1,996
<i>Cyclopterus lumpus</i>	---	21.18	2.45	---	Yao & Crim	1,996
<i>Gadus murhua</i>	---	21.34	2.15	---	Yao & Crim	1,996
<i>Cyprinus carpio</i>	17.6 - 27.7	2.2 - 7.3	---	---	Linhart <i>et al.</i>	1,995
<i>Oreochromis mossambicus</i>	0.10	---	1.70	---	Specker & Suilivian	1,994

El material lipídico contenido en la VTG, esta compuesto principalmente por fosfolípidos (Ng & Idler, 1983), mismos que se encargan del transporte y translocación de la molécula en el sistema circulatorio. La VTG además contiene carotenoides como productos secundarios, que sirven de protección contra la luz, reserva de energía y como antioxidantes. El contenido de fósforo, al igual que los carbohidratos es muy importante para el reconocimiento de los

receptores específicos durante la síntesis de VTG (Opresko *et al*; 1991; Mommsen & Walsh, 1988).

La VTG es incorporada en la membrana del ovocito por medio de receptores específicos (Nuñez, *et al*.; 1996; Lancaster & Tyler, 1994; Mommsen & Walsh, 1988), de alto peso molecular (500,000 kDa), los cuales la reconocen específicamente y se unen a la región en donde se encuentra el fósforo como grupo prostético de la molécula de VTG. (Mommsen & Walsh, 1988). Después de este reconocimiento, la VTG se incorpora al ovocito por medio de micropinocitosis. (Figura No. 1). De aquí que la fosforilación sea crucial para el proceso de reconocimiento e incorporación de VTG por el ovocito (Opresko, *et al*; 1981), al igual que la N-glicosilación, (Mommsen & Walsh, *op. cit.*).

Una vez que la VTG es incorporada en el ovocito, una parte de los receptores es clivada junto con la VTG y otra parte es reciclada a la superficie para seguir captando más moléculas de VTG. El clivage proteolítico de la molécula de VTG no está bien caracterizado (Hickey & Wallace, 1974), pero se presume que el sistema lisosomal esta implicado. Finalmente, los componentes resultantes: las lipovitelininas, fosvitinas y fosvetas son depositadas dentro del citoplasma del ovocito constituyendo los gránulos de vitelo. (Wallace & Selman, 1985).

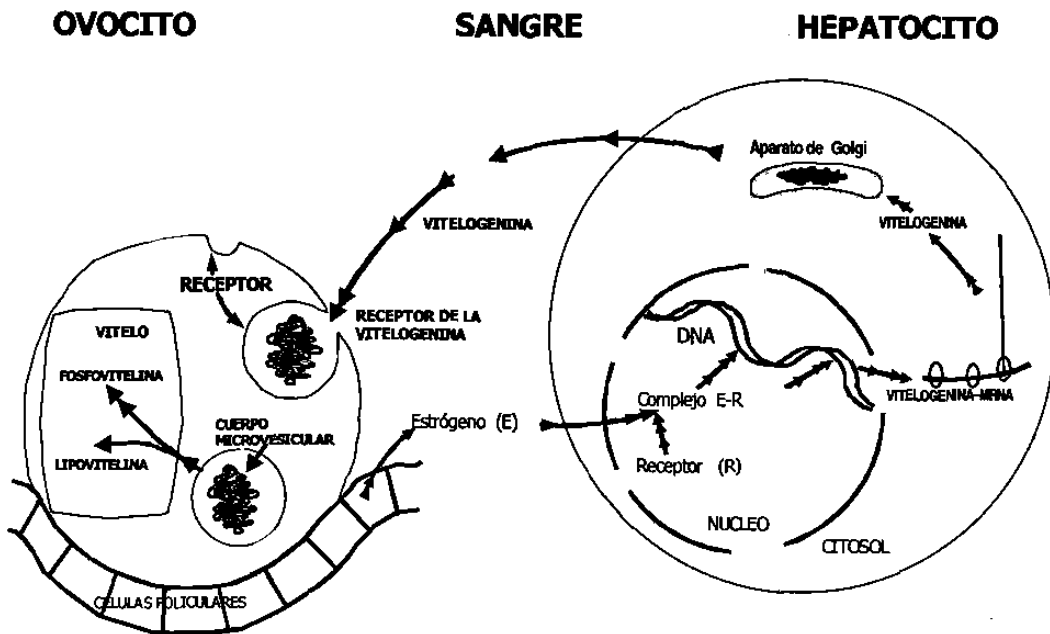


Figura No.1 Simplificación del sistema de retroalimentación entre el ovario e hígado durante la vitelogenénesis exógena. Bajo la influencia de las hormonas gonadotrópicas, las células foliculares del ovocito liberan estrógenos dentro del torrente sanguíneo, los cuales entran a las células blanco (hepatocito) mediante difusión facilitada. Esta señal propicia la síntesis de la VTG que posteriormente será secuestrada del torrente sanguíneo por el ovocito, para su crecimiento.

d) Maduración.

Después de que el ovocito ha completado su crecimiento, durante el proceso de la Vitelogenénesis, se lleva a cabo el proceso de maduración, con la migración del núcleo desde el centro a la periferia del ovocito, en seguida se condensan los cromosomas y se emite el primer cuerpo polar (Benítez, 1992; Jalabert, 1976; Nagahama, 1990). Posteriormente tendrá lugar la ruptura del núcleo (vesícula germinativa) (Zanuy & Carrillo, 1987). Estos cambios ocurren antes de la ovulación, siendo considerados como un pre-requisito para la subsecuente fertilización.

Morfológicamente, la maduración se caracteriza por la clarificación del vitelo (debido a la fusión, por separado, de las sustancias de origen proteico o lipídico) y por un incremento de tamaño debido a la hidratación del ovocito, además de la ruptura de la vesícula germinativa. (Zanuy & Carrillo, 1987). Una vez finalizada la maduración, el ovocito se prepara para la ovulación.

e) Ovulación.

Estrictamente, la ovulación consiste en la expulsión mecánica del ovocito fuera del folículo (Lam, 1985; Jalabert, 1976; Zanuy & Carrillo, 1987) y ocurre solamente después de una fase de desprendimiento entre el ovocito y las células foliculares.

Estudios ultraestructurales han revelado que durante la ovulación, las microvellosidades de las células del folículo y las del ovocito se separan de la membrana o corion. (Pendergrass & Schroeder 1976, Iwamatsu & Ohta, 1977, tomado de Zanuy & Carrillo, 1987). Se piensa que este proceso de interrupción entre la membrana ovocitaria y las células foliculares podría ser originado por enzimas proteolíticas.

En la mayoría de los casos, la ovulación tiene lugar después de la primera división meiótica. (Nagahama, 1987; Verreth, *et al*; 1987). Los ovocitos ovulados continúan con la meiosis hasta la metafase, estado en el cual ya es posible su fertilización, posteriormente es emitido el segundo cuerpo polar. (Zanuy & Carrillo, 1987).

VI.3.- EVALUACION DE LA MADUREZ GONADICA DE HEMBRAS

La evaluación correcta del estadio de madurez gonádica en las hembras es muy importante, ya que de esto depende el éxito de la reproducción inducida hormonalmente (Colunga, 1996). Anteriormente, esta técnica se basaba en interpretaciones subjetivas como son: la forma del cuerpo, el grado de suavidad y distensión del vientre, la apariencia del poro genital, la ausencia de tubérculos nupciales, la coloración y expulsión de los óvulos al presionar suavemente el abdomen, y al factor de condición múltiple, (Rodríguez, 1992).

Actualmente se han desarrollado métodos que permiten una adecuada evaluación de la madurez sexual, tales como las observaciones morfológicas anatómicas e histológicas. Sin embargo, todos estos métodos presentan inconvenientes en mayor o menor grado. Así, en el caso de las de las determinaciones anatómicas e histológicas se requiere el sacrificio de los ejemplares

y en el caso de las observaciones morfológicas para establecer relaciones merísticas se carece de precisión.

Por otra parte, dentro de los métodos directos utilizados para la evaluación gonádica de hembras destacan:

a) La punción abdominal. Este método consiste en extraer una muestra de ovocitos con una jeringa, cuyo diámetro de la aguja sea igual o ligeramente mayor que el de estos, esta se introduce intraperitonealmente a la altura de la aleta pélvica a una profundidad media del ovario. Sin embargo, se ha reportado que este método resulta traumático, y cuando llega a ser mal realizado, favorece a la aparición de enfermedades infecciosas o atresia ovárica. (Rodríguez, 1992).

b) El empleo del endoscopio. Este es un método relativamente nuevo, aplicado a prácticas piscícolas, sin embargo, es muy costoso y presenta dificultad en la interpretación. (Rodríguez, 1992).

c) El monitoreo ovárico por canulación. Este método consiste en la introducción de un tubo de plástico flexible, cánula o sonda por el poro genital de la hembra, para obtener por succión una muestra de ovocitos. (Colunga, 1996). Posteriormente, los ovocitos son transparentados para observar al microscopio la posición de la vesícula germinativa o núcleo durante los estadios de maduración final, que se inician una vez que la hembra ha concluido la Vitelogénesis. Sin embargo, este tipo de métodos no es aplicable en el caso de los Lepisosteidos ya que presentan una condición ginoaria.

d) Determinaciones Bioquímicas. Las determinaciones bioquímicas resultan ser una herramienta más adecuada y precisa para la evaluación de la madurez gonádica de las hembras, ya que cuentan con la ventaja de tratarse de métodos no invasivos, que no requieren del sacrificio de los ejemplares como es el caso de los métodos convencionales. Entre los indicadores bioquímicos más utilizados se encuentran los esteroides, las gonadotropinas y la Vitelogenina.

VI.4.- PURIFICACION DE LIPOVITELINA Y VITELOGENINA.

Diversos autores han recurrido a la purificación y caracterización de la Vitelogenina plasmática y la Lipovitelina ovárica debido a la necesidad de contar con un marcador bioquímico confiable para evaluar la condición gonial de las hembras (Tabla 3). Esta necesidad surgió ante la imposibilidad de poder determinar el éxito de las inducciones hormonales sin recurrir al sacrificio de los individuos para evaluar su estado de madurez gonádica por los métodos antes mencionados.

Tabla No. 3. Diferentes técnicas aplicadas para la purificación y caracterización de la Vitelogenina en diferentes especies.

ESPECIE	TECNICAS UTILIZADAS	RESULTADO	AUTOR	AÑO
<i>Acipenser transmontanus</i>	cromatografía de afinidad, electroforesis gel de agarosa, inmunoprecipitación SDS.	caracterización preliminar de RNAm de vitelogenina	Bidwell, <i>et al.</i>	1,991
<i>Carassius auratus</i>	cromatografía en DEAE-celulosa.	aislamiento de vitelogenina	Hori, <i>et al.</i>	1,979
<i>Cyprinus carpio</i>	filtración en gel de Sepharosa 6B, crom. DEAE-celulosa, ultrafiltración con XM50	purificación y caracterización parcial de vitelogenina	Tyler, <i>et al.</i>	1,990
<i>Fundulus heteroclitus</i>	cromatografía en oligo-dT celulosa PCR	aislamiento de poli-A ¹ RNA	La Fleur, <i>et al.</i>	1,995
<i>Ictalurus nebulosus</i>	cromatografía en DEAE-celulosa, PAGE	aislamiento de vitelogenina	Hickey & Wallace	1,978
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	cromatografía en TEAE-celulosa, RIE	aislamiento de vitelogenina	Campbell & Idler	1,980
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	filtración en gel de Sepharosa 6B	aislamiento de vitelogenina	Sumpter	1,982
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	filtración en gel S-300, radiomarcaje	purificación de vitelogenina	Nagler, <i>et al.</i>	1,992
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	filtración en gel de Sepharosa 6B, crom. DEAE-celulosa, RIE, PAGE.	aislamiento y caracterización del receptor para vitelogenina	Tyler & Lancaster	1,993
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	radiomarcaje, PAGE, filtración en gel	aislamiento de vitelogenina	Lancaster & Tyler	1,994
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	filtración en gel de Sephacryl S-300.	aislamiento de vitelogenina	Nagler, <i>et al.</i>	1,994
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	cromatografía en DEAE-Biogel A, PAGE, filtración en gel de Sepharosa 6B	purificación de vitelogenina	Núñez, <i>et al.</i>	1,996
<i>Oreochromis mossambicus</i>	inmunolectroforesis, PAGE, ELISA	aislamiento de vitelogenina	Kishida & Specker	1,994
<i>Oreochromis niloticus</i>	cromatografía en DEAE-Sephacel, PAGE	purificación de vitelogenina	Chan, <i>et al.</i>	1,991
<i>Oryzias latipes</i>	cromatografía en DEAE-celulosa, PAGE, filtración en gel,	purificación, identificación de vitelogenina	Hamazaki, <i>et al.</i>	1,987

	inmunohistoquímica			
<i>Salmo gairdneri</i>	ultracentrifugación	aislamiento de vitelogenina	Riazi & Fremont	1,988
<i>Salmo gairdneri</i>	filtración en gel de Sepharosa 6B, RIE, espectrofotometría, radiomarcaje	purificación y caracterización de vitelogenina	Tyler, <i>et al.</i>	1,988
<i>Salmo gairdneri</i>	filtración en gel de Sepharosa 6B	purificación de vitelogenina	Tyler, <i>et al.</i>	1,990
<i>Salmo salar</i>	cromatografía en TEAE-celulosa	aislamiento de vitelogenina	Idler, <i>et al.</i>	1,979
<i>Salmo salar</i>	filtración en gel de Sepharosa 6B, PAGE	purificación de vitelogenina	Le Bail & Breton	1,981
<i>Salmo trutta</i>	cromatografía en DEAE-Sephacel, PAGE	purificación de vitelogenina	Norberg & Haux	1,985
<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	Ouchterlony, RIE, inmunoelectroforesis	caracterización de vitelogenina	Balestra, <i>et al.</i>	1,991

Para llevar a cabo la purificación de estas moléculas se han utilizado, de manera general, las siguientes técnicas:

a) Ultracentrifugación:

La aplicación de la fuerza centrífuga a las moléculas en solución les proporciona una velocidad de sedimentación que permite separar las proteínas dependiendo de su tamaño, masa y densidad relativa al solvente.

b) Precipitación:

Este método tiene como fundamento la precipitación de proteínas por adición de EDTA en presencia de iones divalentes como el calcio, magnesio, manganeso o fierro (Wiley, *et al.*; 1979) que al unirse al fósforo de la VTG o VTL aumentan su masa y su consecuente precipitación.

Con esta técnica se logra la separación selectiva de la Vitelogenina de las demás proteínas contenidas en el plasma.

c) 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 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 que presentan las moléculas de penetrar en los poros de las partículas utilizadas como relleno o matriz; esto depende directamente de su

masa; cuanto menores sean, más profundamente entrarán y el tiempo en que eluirán a través de la columna será mayor, lo cual permite la separación de dichas moléculas.

La Cromatografía de Exclusión Molecular (filtración en gel) permite aislar las lipoproteínas previamente separadas, en base a su masa molecular.

d) Cromatografía de Intercambio Iónico:

La Cromatografía de Intercambio Iónico está basada en la interacción que existe entre las moléculas de soluto cargadas eléctricamente y su contraparte (con carga opuesta) ligada covalentemente a una matriz cromatográfica.

Esta técnica permite separar aquellas lipoproteínas con rango de peso molecular similar, por medio de su carga iónica.

VI.5.- CARACTERIZACION DE VTG.

La caracterización de la Vitelogenina se basa en la determinación bioquímica de sus grupos prostéticos, ya que se sabe que su naturaleza química involucra la presencia de lípidos, fósforo, carbohidratos (en pequeñas cantidades) y carotenoides.

a) Determinación de lípidos:

Para determinar los lípidos se realiza comúnmente la técnica de tinción con el colorante Negro Sudan B, el cual al ser incubado con las muestras problema a una temperatura de 37°C, se une a la porción lipídica presente en las muestras. (Allen & Budowle, 1994).

b) Detección de fósforo:

Dentro de los métodos utilizados para la detección de fósforo en una muestra determinada se encuentra el propuesto por Fiske-Subbarrow (1929), el cual se fundamenta en la reducción del fósforo presente en una muestra al adicionar un agente reductor como el ácido molíbdico, dando lugar a la formación de un cromógeno verde (ácido fosfomolíbdico), detectable en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

c) Determinación de carbohidratos:

La técnica más comúnmente utilizada para determinar residuos de carbohidratos en plasma consiste en la adición de O-Toluidina. La prueba se basa en las reacciones furfurálicas de las osas, las cuales en un medio fuertemente ácido y en presencia de calor son deshidratadas en furfurales o sus derivados; éstos se condensan adicionando fenoles o aminas cíclicas, dando lugar a la producción de sustancias coloreadas detectables en un espectrofotómetro a 630 nm. (Dubowsky, 1962).

d) Detección de carotenoides.

El fundamento para llevar a cabo la detección de carotenoides consiste en la posibilidad de los mismos de absorber luz a cierta longitud de onda, misma que puede ser medida en un espectrofotómetro.

e) Electroforesis:

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) está considerada como un método analítico altamente resolutivo, ya que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrimiento, lo cual la hace una herramienta eficaz para realizar separaciones, aislamientos, evaluaciones de pureza y cuantificación del peso molecular. Es un método relativamente sencillo y de rápida operación; posee una alta precisión en sus detecciones; no produce daños a las sustancias delicadas como las proteínas y ácidos nucleicos; además, es un método muy útil para separar componentes individuales de mezclas complejas.

Esta técnica permite separar e identificar las moléculas aisladas en base a su masa molecular y/o carga iónica, así como calcular el peso molecular de la Vitelogenina.

VII.- METODOLOGIA

VII.1.- *Material biológico.*

El presente estudio se realizó con ejemplares adultos de *Atractosteus tropicus*, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Acuicultura de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, a los cuales se les aplicó un tratamiento con estrógenos. Adicionalmente, se capturaron ejemplares pre-púberes (juveniles que aún no habían entrado en época de reproducción), que fueron utilizados como controles, así como hembras en estado de reproducción, de cuya gónada se purificó la Lipovitulina ovárica.

VII.2.- *Inducción con 17 β -estradiol.*

Tomando en cuenta que el uso de estrógenos en la mayoría de los peces machos tienen un efecto estimulante en el hígado para que éste inicie la síntesis de Vitelogenina, se procedió a inducir con 17 β -estradiol a ejemplares machos de pejelagarto. Esto se realizó con el fin de identificar la molécula en el plasma al comparar los cromatogramas obtenidos de las muestras de machos inducidos con los de machos control (no inyectados) y con los cromatogramas de hembras maduras.

Para llevar a cabo este experimento se contó con 2 ejemplares adultos de pejelagarto machos debidamente marcados y pesados, los cuales fueron inducidos con 17 β -estradiol mediante inyecciones intraperitoneales a una dosis de 10 mg/Kg de peso, utilizando como vehículo aceite de hígado de bacalao a razón de 10 mg de 17 β -estradiol/mL de aceite. De manera colateral se utilizaron 2 controles negativos, a los cuales únicamente se les administró el vehículo. (Tabla 4).

Tabla No. 4. Modelo de inducción con 17B-Estradiol en ejemplares de pejelagarto machos.

Marca del ejemplar	Peso (gramos)	Dosis (mL.)	Tratamiento	Ubicación
85	1,799	1.7	Aceite de hígado bacalao	Estanque # 5
63	1,293.8	1.3	Aceite de hígado bacalao	Estanque # 5
89	1,441	1.4	17B-Estradiol en aceite	Estanque # 4
76	1,706.2	1.7	17B-Estradiol en aceite	Estanque # 4

Las inducciones se realizaron durante 4 semanas consecutivas, realizando muestreos cada semana, para ello se extrajeron 2 mL de sangre de cada individuo y se centrifugaron a 5,000 r.p.m. Al término del ensayo, los ejemplares inducidos fueron sacrificados para extraerles la totalidad de la sangre y obtener el plasma, necesario para la purificación y caracterización de la Vitelogenina.

VII.3.- Extracción de muestras de gónadas.

Se realizó la disección de dos hembras maduras de pejelagarto para llevar a cabo la extracción de gónadas, necesarias para elaborar los extractos, a partir de los cuales se purificó la Lipovitelina ovárica.

VII.4.- Purificación de la VTG y VTL.

a) Preparación del extracto de ovario:

La preparación del extracto de ovario consistió en colocar 1g de gónada en un tubo de ensayo, al cual se le adicionaron 4 mL de un buffer Tris-HCl 50mM, pH 8 conteniendo el inhibidor de proteasas PMSF 1mM. Posteriormente, se homogenizó en frío en un Polytron y se centrifugó dos veces a 5,000 r.p.m. durante 15 minutos a una temperatura de 4°C utilizando una centrifuga Eppendorf 5804 R con el fin de eliminar los residuos y el material graso. El sobrenadante obtenido se separó en alícuotas de 1mL y se almacenaron a -30°C para su posterior utilización en la purificación de Lipovitelina.

b) Preparación de muestras de sangre:

Las muestras de sangre tanto de hembras maduras como de machos, se obtuvieron mediante punción caudal. Para ello, los ejemplares fueron previamente anestesiados con Finquel (MS-222). Las muestras se colectaron en tubos heparinizados conteniendo 1% de PMSF. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C y el plasma obtenido se conservó en alícuotas contenidas en tubos Eppendorf a una temperatura de -30°C. Estas muestras fueron utilizadas para llevar a cabo la purificación de Vitelogenina.

c) Precipitación con EDTA y MgCl₂:

Tanto los extractos de ovario como el plasma fueron colocados por separado en tubos para centrifuga estériles de polipropileno (Falcon Plastics, Inc.) en alícuotas de 5 mL., posteriormente se les adicionó 20 mL de una solución de EDTA 20mM ajustando el pH a 7.7 con NaOH. Enseguida se les agregó 1.5 mL de MgCl₂ 0.5M y se mezclaron por inversión. El siguiente paso consistió en una centrifugación a 2,500 r.p.m. por espacio de 30 minutos a una temperatura de 4°C para después desechar los sobrenadantes y conservar los precipitados, a los cuales se les adicionó 3 mL de un buffer (Tris-HCl 50mM, pH 7.5, NaCl 1M) y se agitaron cuidadosamente con una varilla de vidrio. Nuevamente se centrifugaron bajo las mismas condiciones, pero esta vez conservando los sobrenadantes, a los que se les añadió 25 mL de agua destilada. Enseguida, se procedió a realizar una última centrifugación similar a las anteriores para desechar los sobrenadantes. Por último, los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en 3 mL del buffer utilizado anteriormente.

d) Cromatografía de Filtración en gel:

La Cromatografía de Filtración en gel se llevó a cabo en un Sistema GradiFrac con una Bomba P-50 y un Monitor UV-1 (Pharmacia Biotech), utilizando una matriz de Sepharosa-6B (Pharmacia Biotech), la cual se empacó en una columna tipo XK de 26 mm x 70 cm (Pharmacia Biotech). La columna fue equilibrada con un buffer (Tris-HCl 50mM, NaCl 1%, MgCl₂ 1mM, PMSF 1mM, pH 8) a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se inyectó 1 mL de las muestras previamente precipitadas con EDTA y MgCl₂, las cuales fueron eluidas con el mismo buffer de equilibrio. Las condiciones de corrida fueron: UV= 0.5, tasa de flujo= 1mL/min., papel=

1mm/min colectando fracciones de 4 mL para monitorear su densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 2.

e) Cromatografía de Intercambio Iónico.

Esta fase de purificación se llevó a cabo con el mismo sistema cromatográfico utilizado para la Cromatografía de Filtración en gel. Las muestras de plasma de machos inducidos, previamente precipitadas con EDTA y $MgCl_2$ fueron aplicadas (1 mL) sobre una columna tipo XK de 16 mm x 40 cm (Pharmacia Biotech) empacada con DEAE-Sephacel (Pharmacia Biotech) en un buffer inicial (Tris-HCl 50mM, PMSF 1mM, pH 8). La matriz fue activada con 2 volúmenes de un buffer (Tris-HCl 50mM, KCl 0.5M, PMSF 1mM, pH 8) a una temperatura de 4°C. Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal de KCl (de 0 a 0.50M en buffer inicial) y se colectaron fracciones de 4 mL para monitorear su densidad óptica a 280 nm. Las condiciones de corrida fueron: UV= 0.5, tasa de flujo= 0.3 mL/min, papel= 0.5 mm/min.

VII.5.- Caracterización de la VTG y VTL:

Las fracciones proteicas obtenidas a través del protocolo de purificación secuencial fueron sometidas a las siguientes determinaciones:

a) Determinación de lípidos.

Los lípidos contenidos en las muestras fueron determinados por medio de la técnica de Negro Sudan B, descrita por Allen & Budowle (1994). Se colocaron 250 μ L de las muestras, enseguida se les agregó la misma cantidad del colorante Negro Sudan B, se mezclaron y se incubaron en oscuridad durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 r.p.m. por espacio de 15 minutos. Finalmente, se determinó la absorbancia del sobrenadante a 553 nm.

b) Determinación de carotenoides.

Para determinar la presencia de carotenoides en las muestras, primeramente se realizó un barrido del extracto de ovario en el espectrofotómetro en un rango de longitud de onda entre 260

y 700 nm para determinar el pico máximo de absorbancia y una vez que se encontró la longitud de onda adecuada, se determinó la absorbancia de las fracciones obtenidas por Cromatografía y los resultados obtenidos fueron graficados.

c) Determinación de fósforo.

El fósforo contenido en las muestras fue determinado mediante una modificación del método de Fiske-Subbarow (1925). Se colocaron 500 μ L de cada una de las fracciones obtenidas con 1 mL de buffer (Tris-HCl 50mM, PMSF 1mM, pH 8), enseguida se les adicionó 500 μ L de ácido molíbdico ($\text{H}_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} + \text{H}_2\text{O}$) y 500 μ L del reactivo reducido ($\text{NaHSO}_3 + p$ -metilaminofenol). Por último, se les añadió 2,500 μ L de H_2O , y en seguida se mezclaron y se mantuvieron en reposo durante 20 minutos, para después registrar la absorbancia en el espectrofotómetro a 750 nm y graficar los resultados. La concentración de fósforo se calculó mediante una curva estándar a partir de una solución de KH_2PO_4 (10 μ g/mL).

d) Determinación de carbohidratos.

Para detectar la presencia de carbohidratos en las fracciones se utilizó la técnica de la o-Toluidina, la cual consistió en colocar 1 mL de cada fracción en tubos eppendorf, a los que se les aplicó 5 mL del reactivo o-Toluidina, posteriormente se mezclaron y se mantuvieron en Baño María durante 10 minutos, para determinar su absorbancia a 630 nm y graficar los resultados obtenidos.

e) Determinación del peso molecular.

Para determinar el peso molecular de las fracciones proteicas obtenidas mediante las técnicas de Filtración en gel e Intercambio Iónico se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6% utilizando un marcador de peso molecular con una mezcla de monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros de Hemocianina (SIGMA) que van de 70,000 a 280,000 Daltones de peso molecular. Se colocaron 40 μ g de proteína de las diferentes muestras en cada carril y se corrieron en una cámara de electroforesis vertical EPS 600 (Pharmacia Biotech) a una temperatura de cámara de 4°C, con un voltaje de 100 v y una intensidad de 60 mA durante 4:45 horas, para después revelar los resultados utilizando el colorante Azul de Coomassie R-250 (SIGMA).

VIII.- RESULTADOS

VIII.1.- PURIFICACION DE VTG y VTL.

Una vez que se obtuvieron las muestras de plasma de machos inducidos con 17β -*estradiol* y los extractos de gónada de hembra madura, se procedió a realizar la purificación de las moléculas de VTG y VTL por medio de los métodos cromatográficos de Filtración en gel e Intercambio de iones.

a) *Cromatografía de Filtración en gel de Sepharosa-6B.*

Las muestras de plasma de los machos control (sin *estradiol*) mostraron un patrón de proteínas similar durante las cuatro semanas que fueron monitoreados. En estas muestras se observa una mayor concentración de proteínas entre las fracciones No. 40 a 73, las cuales desaparecen cuando el plasma es sometido al proceso de precipitación selectiva (**Figura No. 2**).

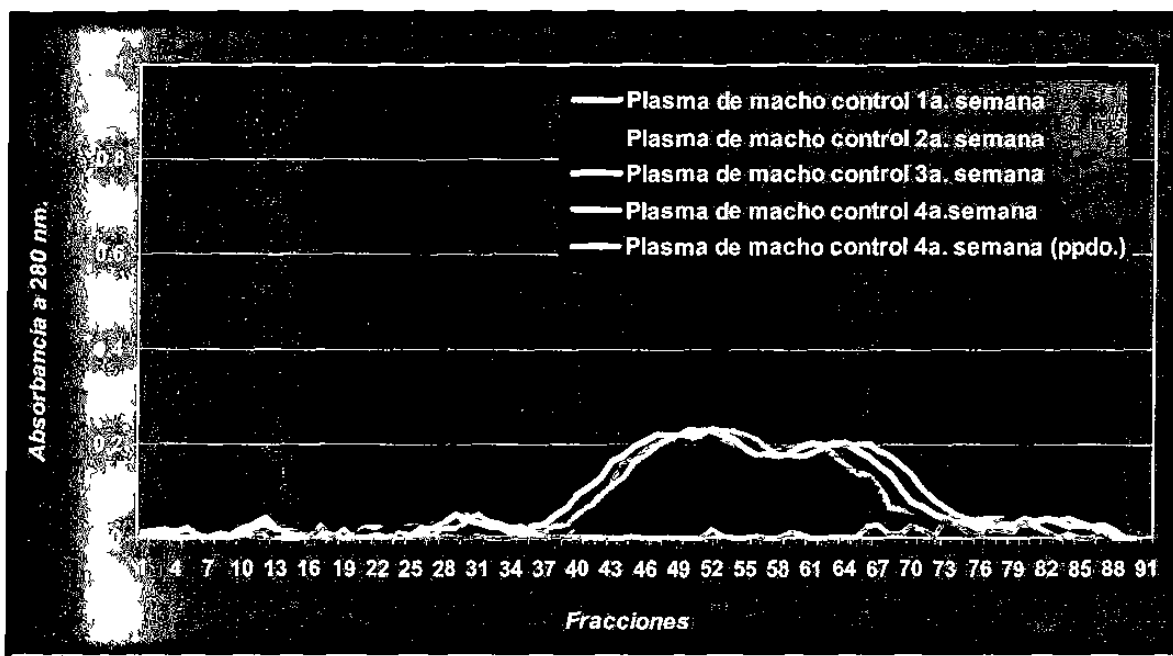


Figura 2.- Perfil de una muestra de plasma de macho control durante las 4 semanas

Por otra parte, en las muestras de plasma de machos tratados con 17β -estradiol se pudo observar un incremento progresivo en la concentración de las proteínas con picos de elusión máxima en las fracciones No. 29 y 52, siendo significativamente mayor el incremento para las proteínas de la fracción No. 52 (Figura No. 3).

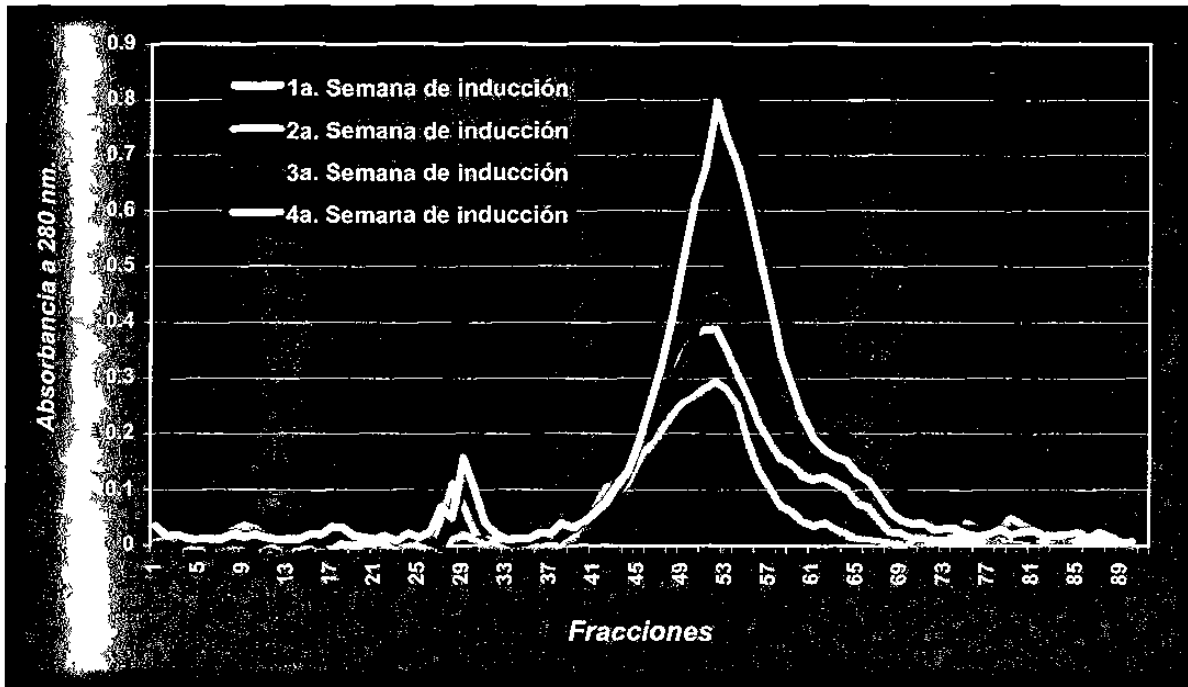


Figura 3.- Perfil de una muestra de plasma de macho durante las 4 semanas de inducción con 17β -estradiol.

Al comparar el patrón de proteínas plasmáticas entre los machos inducidos con los machos control se pudo observar que la principal diferencia se encontraba en la concentración de proteínas que se localizaban en las fracciones No. 29 y 52 (Figura No. 4).

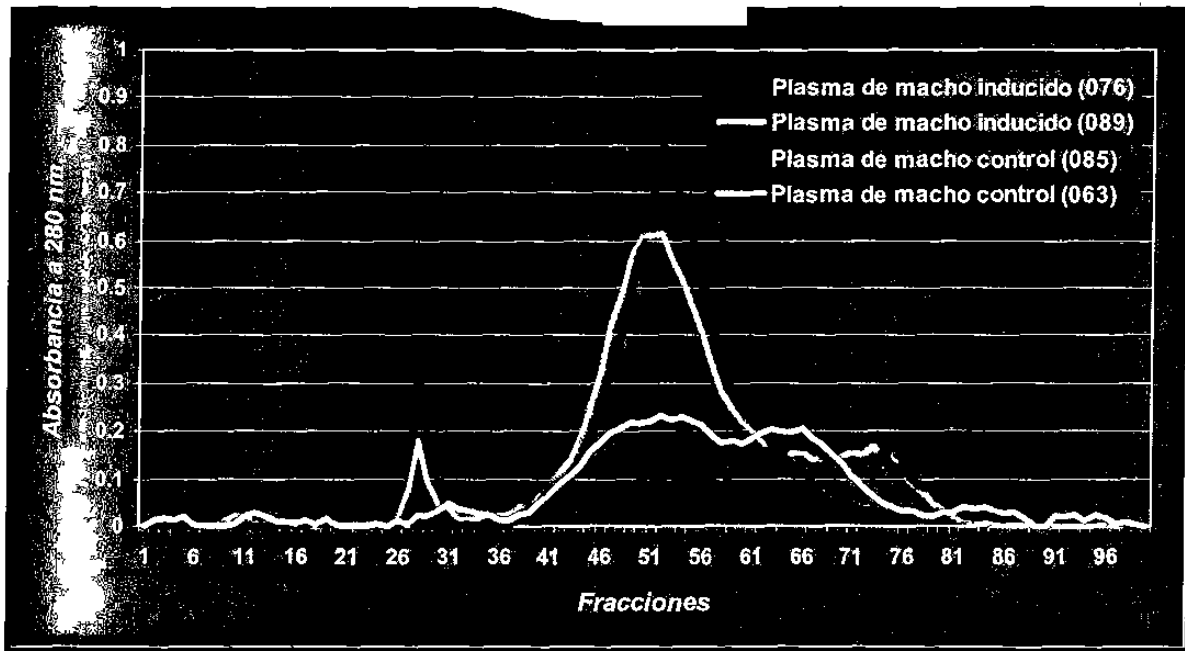


Figura 4.- Comparación de los cromatogramas de las muestras de plasma de machos inducidos con 17β -estradiol de la 4a. semana con los plasma de los machos control.

Cuando el plasma de los machos inducidos con 17β -estradiol fue sometido al proceso de precipitación selectiva se pudo observar que las proteínas con el pico de elusión en la fracción No. 29 desaparecieron, mientras que las proteínas con el pico de elusión en la fracción No. 52 permanecieron. Sin embargo, en este caso se observó que este pico proteico era más estrecho, indicando que algunas proteínas que se encontraban en este pico fueron igualmente eliminadas con el proceso de precipitación (Figura No. 5).

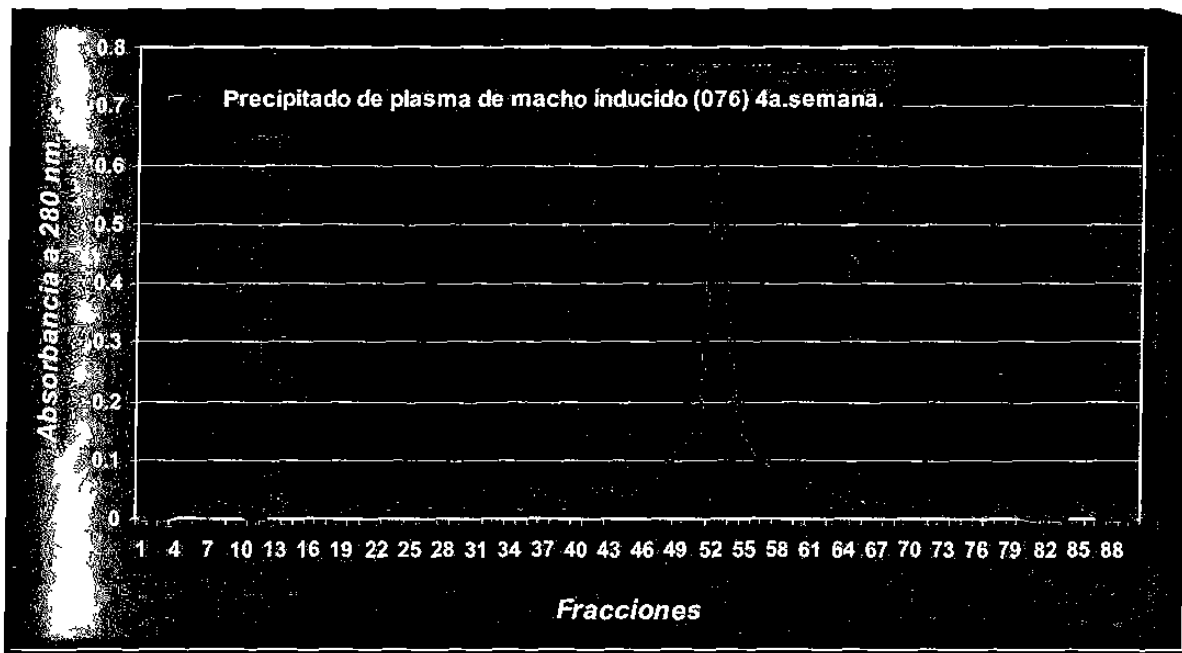


Figura 5.- Cromatograma obtenido de una muestra de plasma de macho inducido con 17β -estradiol de la 4a. semana precipitado con EDTA y $MgCl_2$

Por otra parte, las muestras de gónadas de hembras maduras, al ser sometidas al proceso de precipitación selectiva, mostraron un pico proteico mayoritario con el ápice igualmente en la fracción no. 52 (Figura No. 6).

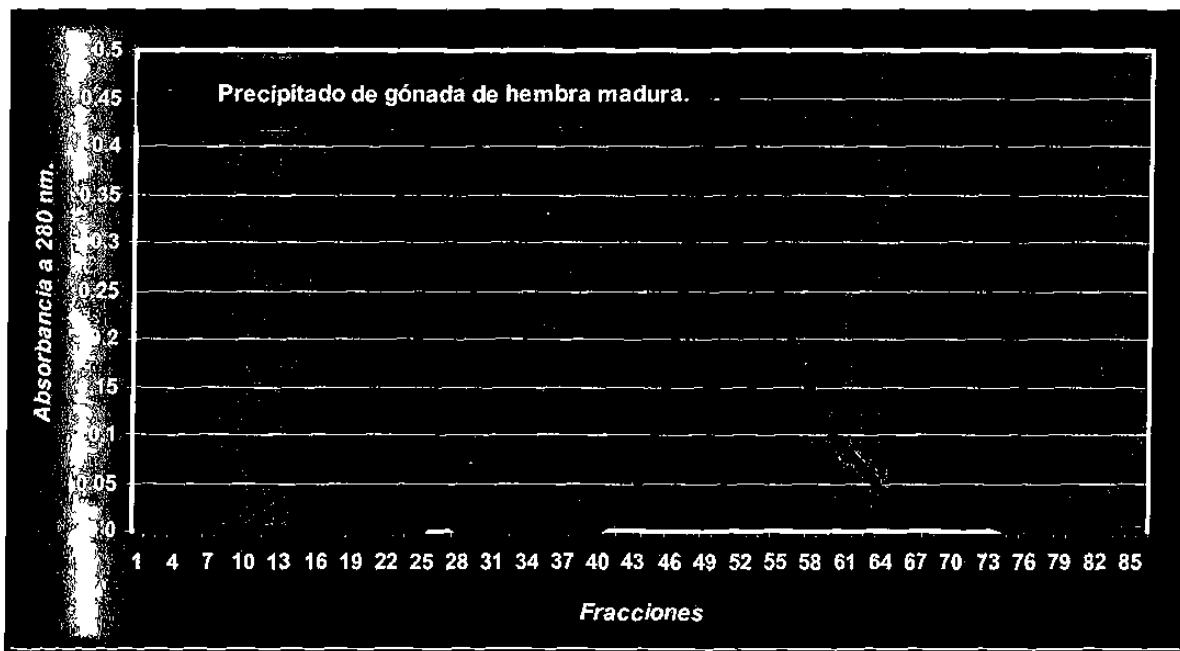


Figura 6.- Cromatograma obtenido de un extracto de gónada de hembra madura precipitado con EDTA y $MgCl_2$

De esta forma, si se observa de manera integral la comparación de los cromatogramas obtenidos a partir de las diferentes muestras procesadas, es posible observar que tanto el extracto de gónada de hembra madura como los plasmas de machos inducidos con 17β -estradiol, coinciden con la presencia de un pico proteico localizado en la fracción No. 52 (Figura No. 7). Indicando que tanto la VTG plasmática como la VTL ovárica se encuentran en esta fracción proteica.

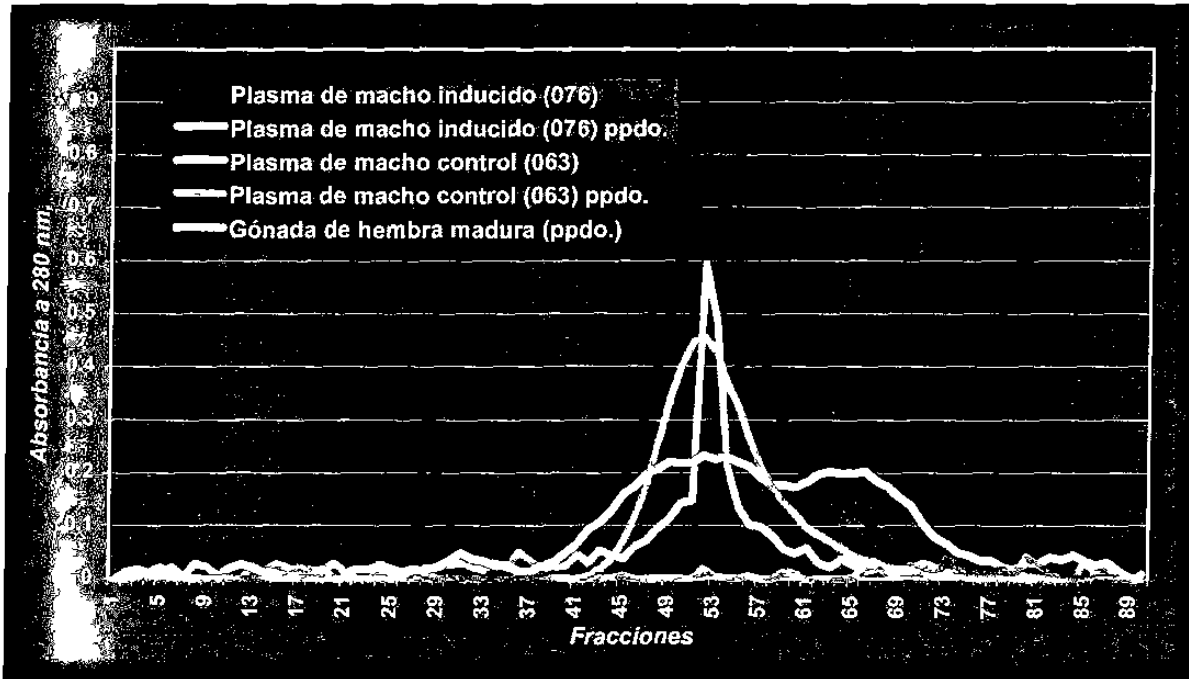


Figura 7.- Comparación de los cromatogramas obtenidos de las diferentes muestras procesadas por Filtración en gel.

b) Cromatografía de Intercambio Iónico

Los precipitados obtenidos de una muestra de plasma de macho inducido con 17β -estradiol de la 4a semana y de un extracto de gónada de hembra madura fueron sometidos a Cromatografía de Intercambio Iónico utilizando un gradiente lineal de KCl 0.5M del 0 al 100% (figura No. 8) lo que permitió observar picos simétricos entre las fracciones 3 - 9, indicando que en ambas muestras se trataba de la proteína mayoritaria, presumiblemente VTG y VTL, respectivamente.

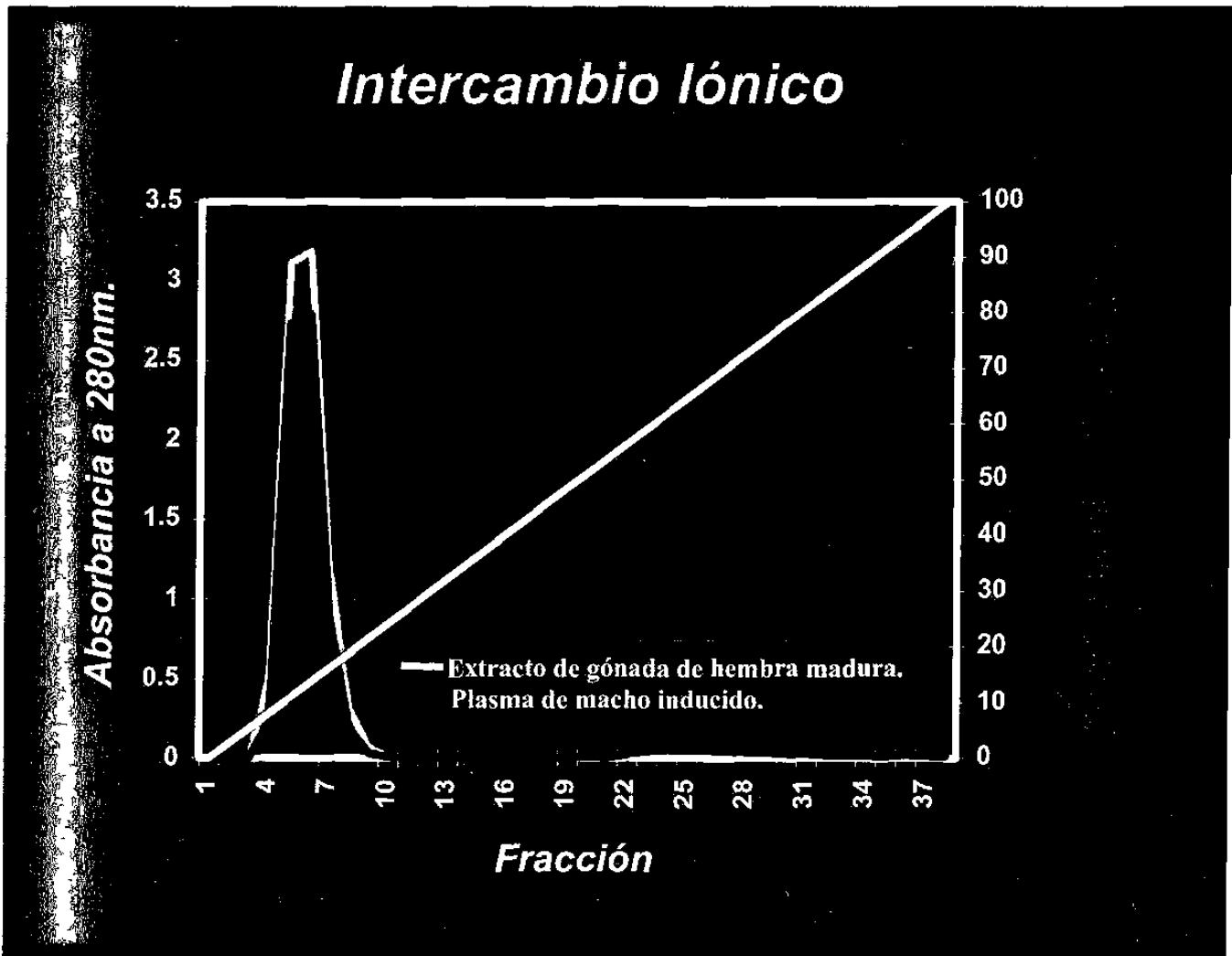


Figura 8.- Muestras de plasma de macho inducido con 17β -estradiol de la 4a. semana y de un extracto de gónada de hembra madura después de someterlos a Cromatografía de Intercambio Iónico (DEAE-Sephacel) eluidas con un gradiente lineal de KCl 0.5M en un buffer (Tris-HCl 50mM, KCl 0.5M, PMSF 1mM, pH 8) a una tasa de flujo de 0.3mL./min.

VIII.2.- CARACTERIZACION DE LA VTG Y VTL.

Las fracciones de los picos proteicos obtenidos de la purificación de muestras de plasmas de machos inducidos fueron sometidos a un proceso de caracterización en base a sus grupos prostéticos.

a) Determinación de lípidos.

localizado entre las fracciones 45-59, cuyo ápice se encuentra en la fracción No. 52. (figura No. 9)

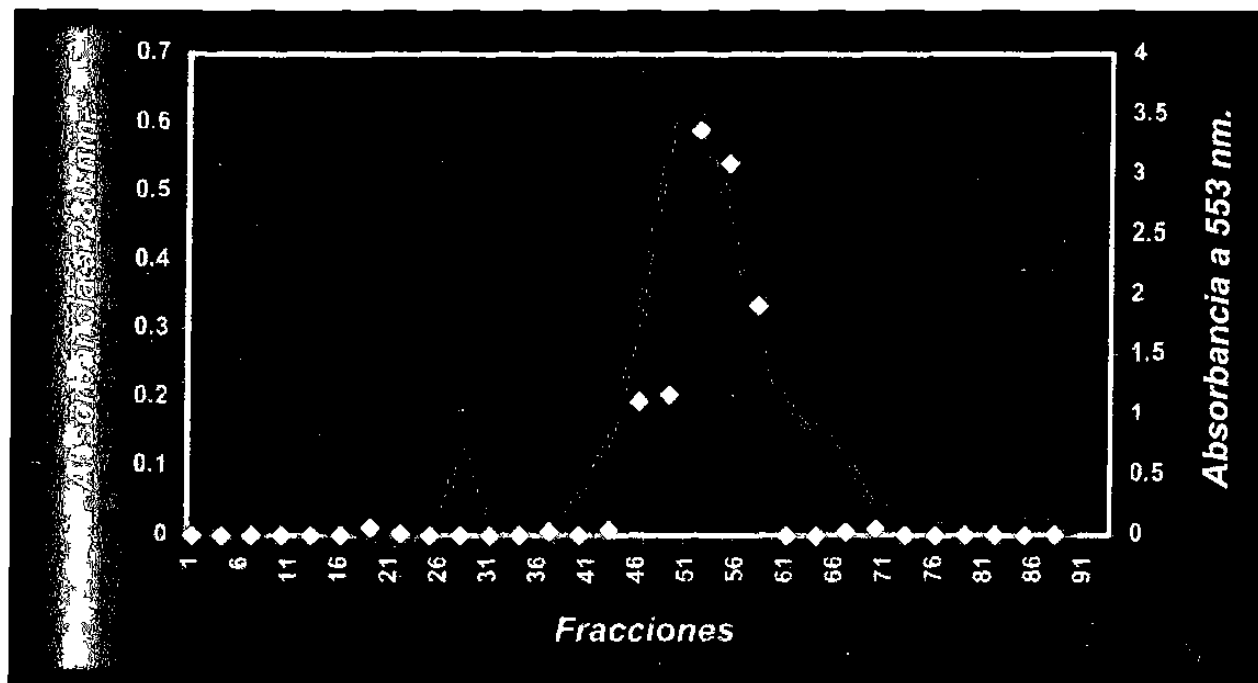


Figura 9.- Contenido de lípidos presente en las fracciones de una muestra de plasma de macho inducido con 17β -estradiol de la 4a. semana, determinados mediante la técnica de Negro Sudan B.

b) Determinación de carotenoides.

Se realizó un barrido en el espectrofotómetro de un extracto de gónada de hembra madura en un rango de longitud de onda entre 260 y 700 nm (figura No. 10) en la que se observó un pico de absorbancia máxima a una longitud de onda de 409 nm, la cual fue utilizada para detectar los carotenoides presentes en las muestras de plasma de machos inducidos.

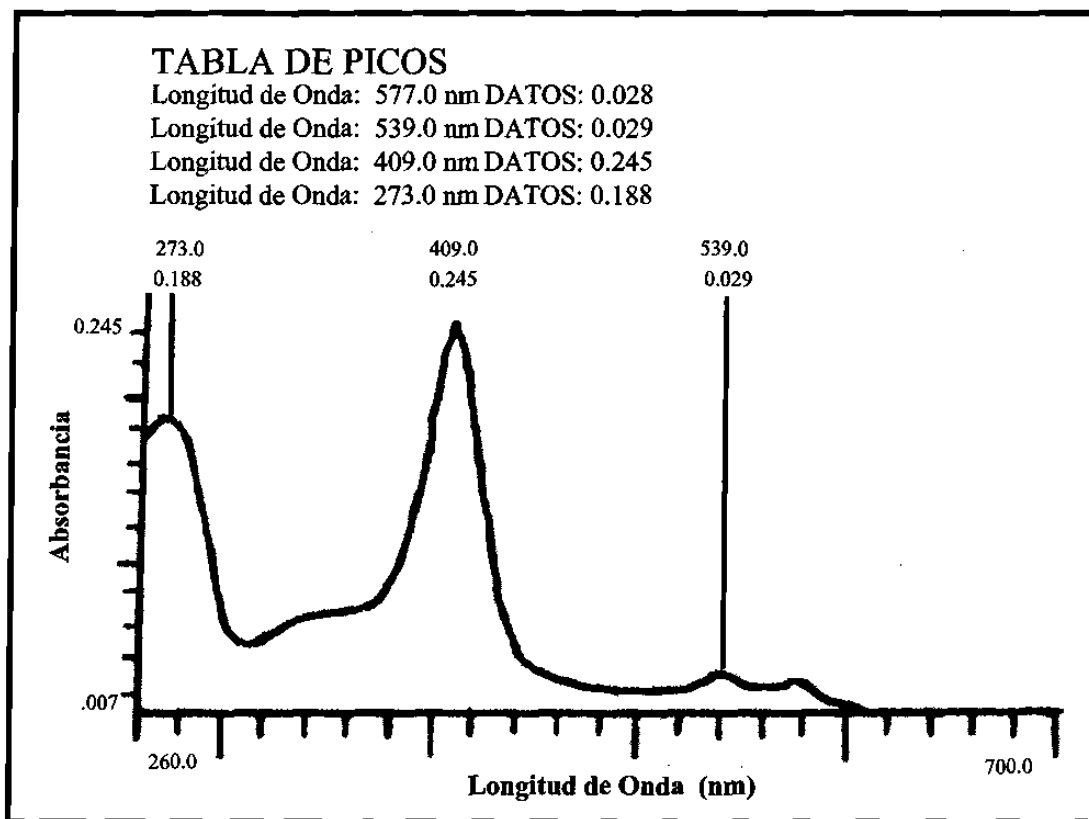


Figura 10.- Barrido de un extracto de gónada de hembra madura de pejelagarto en un rango de longitud de onda entre 260 y 700 nm.

El contenido relativo de carotenoides presente en las fracciones de filtración en gel de una muestra de plasma de macho inducido con 17β -estradiol de la 4a semana, se observa tanto en el pico localizado en la fracción No. 29 como en el de la fracción No. 52. (**figura No. 11**).

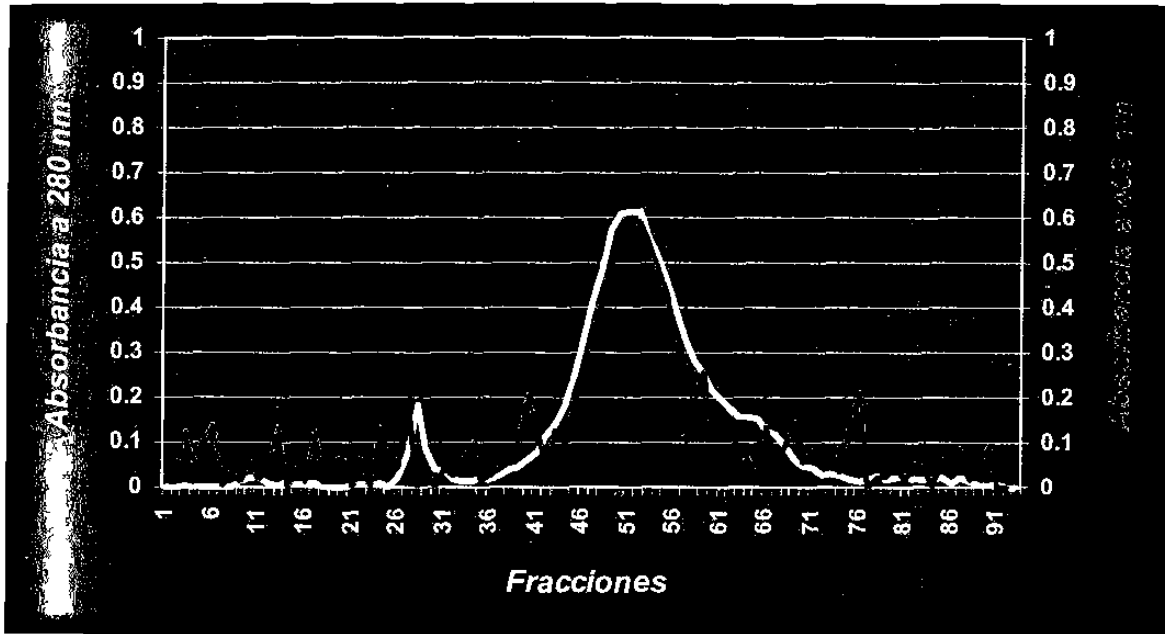


Figura 11.- Determinación de los carotenoides presentes en una muestra de plasma de macho inducido con 17β -estradiol de la 4a. semana.

c) Determinación de fósforo.

El fósforo contenido en las fracciones del plasma de macho inducido con 17β -estradiol de la 4a semana muestra, al igual que los carotenoides, que tanto en el pico localizado en la fracción No. 29 como en el de la fracción No. 52 esta presente este elemento. (Figura No. 12).

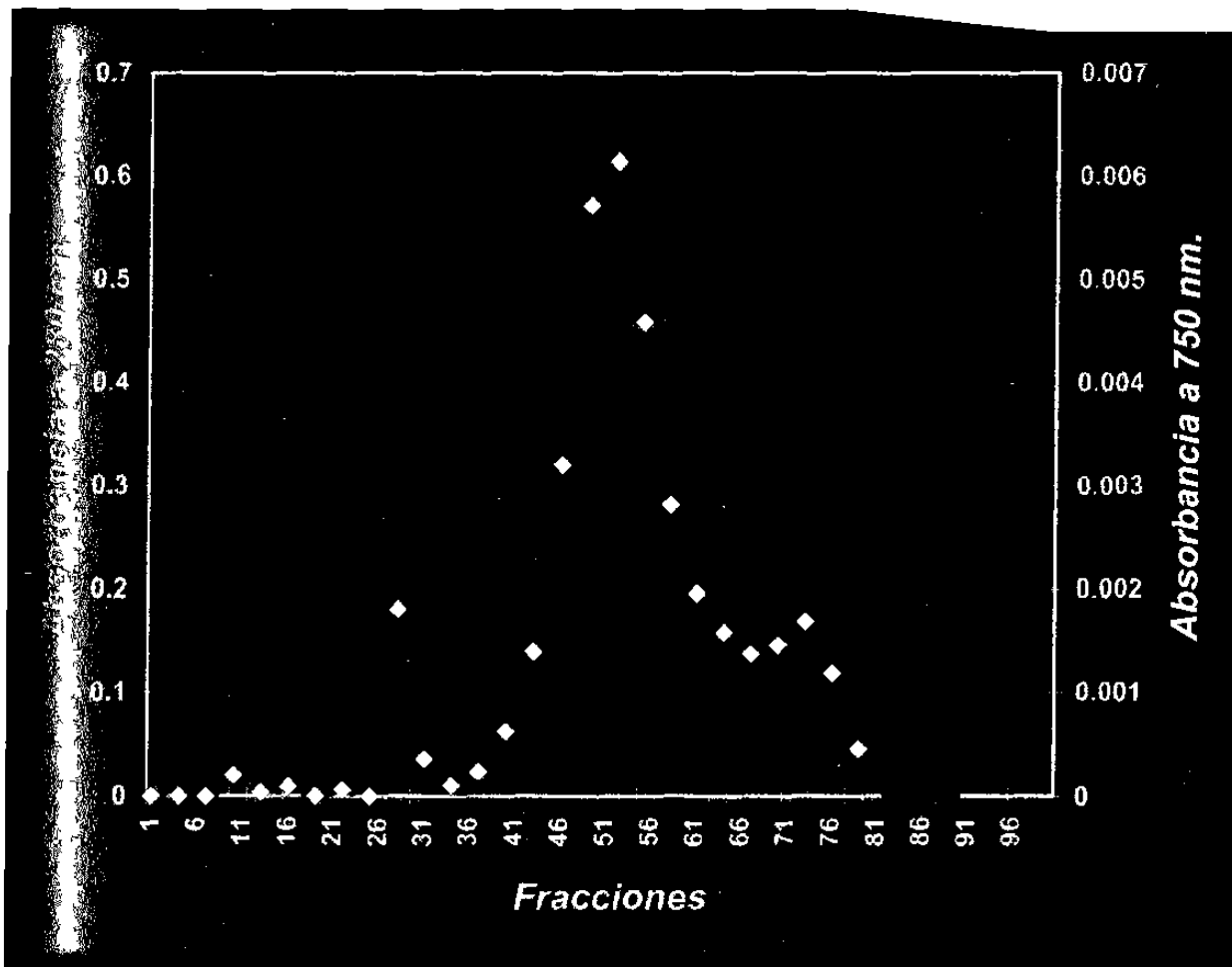


Figura 12.- Determinación del fósforo presente en una muestra de plasma de macho inducido con 17 β -estradiol de la 4a semana mediante una modificación del método de Fiske-Subbarow, 1925.

d) Determinación de carbohidratos.

En este caso, igualmente en las muestras de macho inducido de la 4a semana, se pudo determinar que únicamente el pico proteico con ápice en la fracción No. 52 contienen carbohidratos.(figura No. 13).

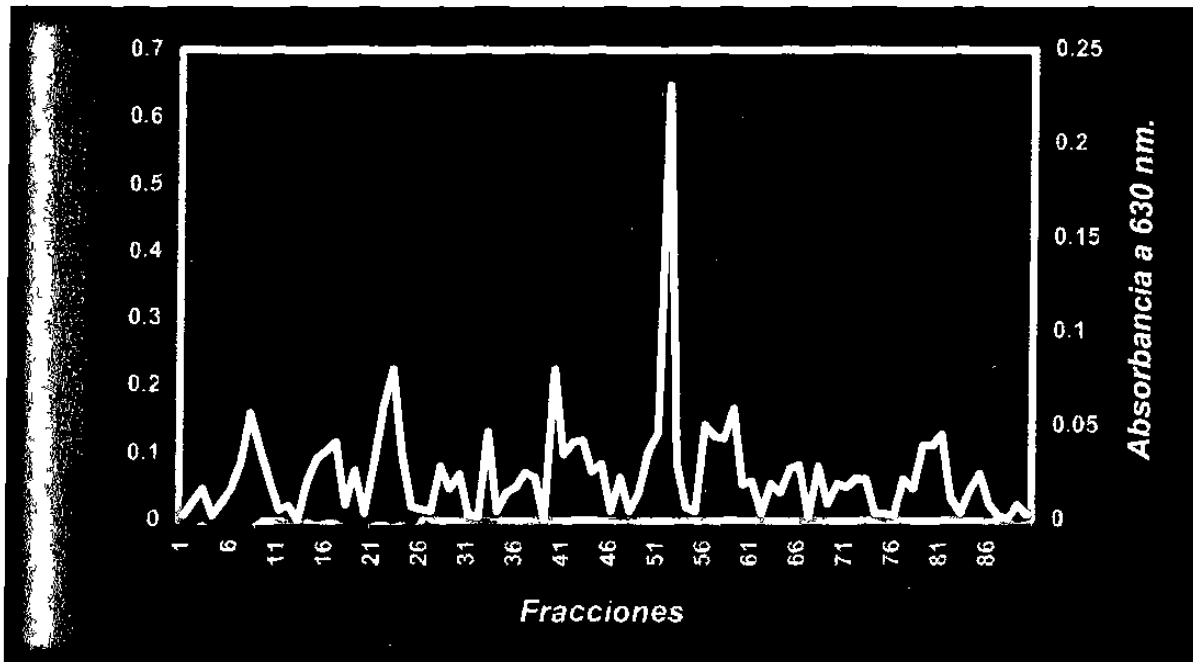


Figura 13.- Determinación de los carbohidratos presentes en una muestra de plasma de macho inducido con 17β -estradiol de la 4a semana mediante la técnica de la *o*-Toluidina.

De esta forma, podemos señalar que únicamente la fracción proteica con ápice fracción 52 presenta en su estructura grupos lipídicos, de carotenoides, de fósforo y de carbohidratos, los cuales son característicos de las moléculas de vitelogenina.

e) Determinación del peso molecular.

En la electroforesis de las diferentes muestras fue posible observar que las bandas de proteínas con las características de la VTG plasmática y VTL ovárica presentan un peso molecular de 195 y 192 KDa., respectivamente. (Figuras No. 14 y 15 y Tabla No. 5).

GEL DE ELECTROFORESIS

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

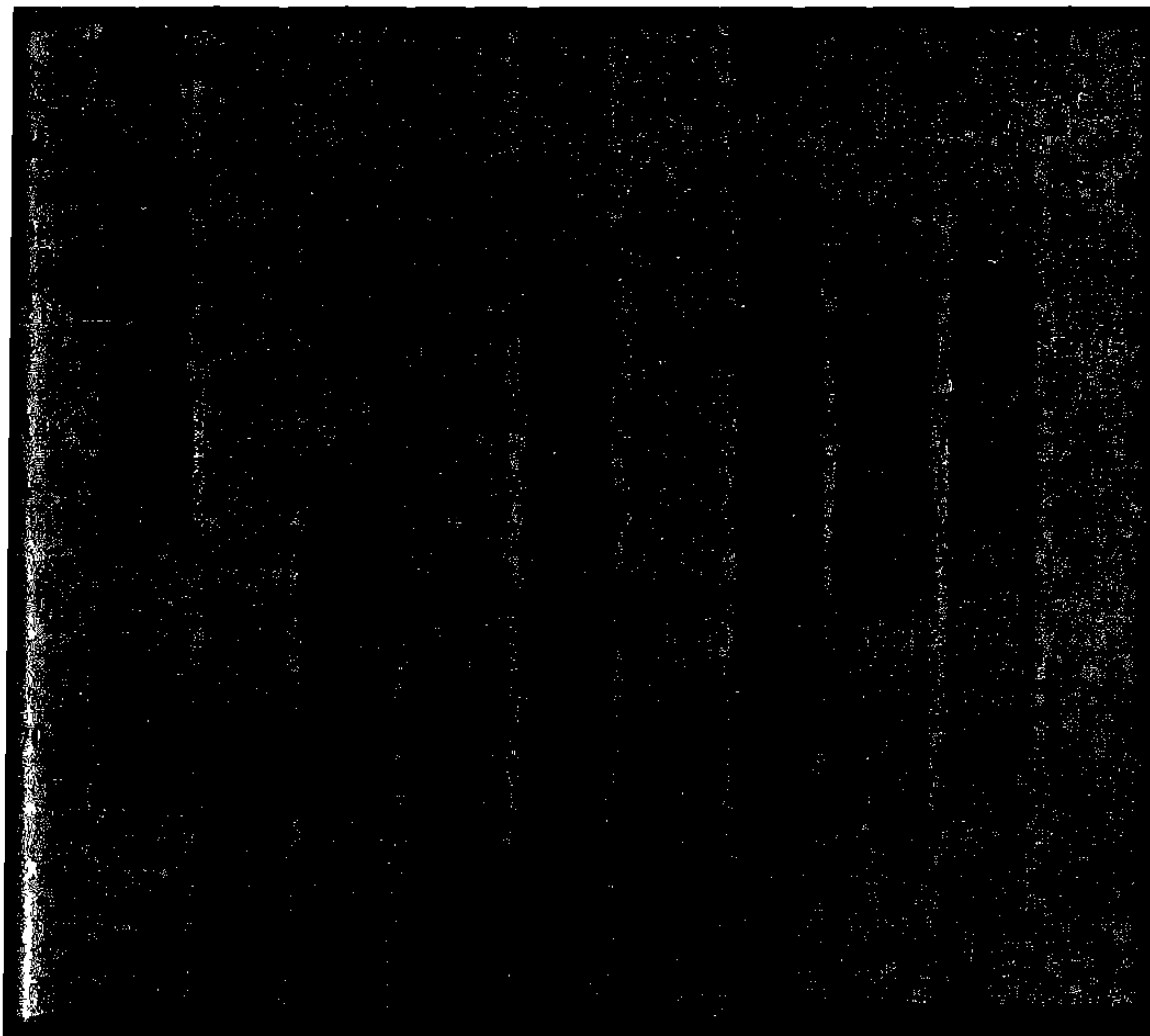


Figura 14.- Perfiles de elución en gel SDS-PAGE al 6%. Muestras: buffer de corrida (carril 1); marcador de Peso Molecular (carril 2); plasma de ejemplar control "aceite de hígado de bacalao" (carril 3); muestra de plasma degradado (carril 4); muestra de plasma degradado (carril 5); muestra de plasma fresco de la 4a semana de tratamiento con 17B-Estradiol (carril 6); plasma de ejemplar control "aceite de hígado de bacalao" (carril 7); muestra de extracto de gónada de hembra madura (carril 8); muestra de precipitado de plasma de la 4a semana de tratamiento con 17B-Estradiol (carril 9); muestra del pico de VTG obtenido por Filtración en gel de Sepharosa-6B (carril 10); buffer de corrida (carril 11).

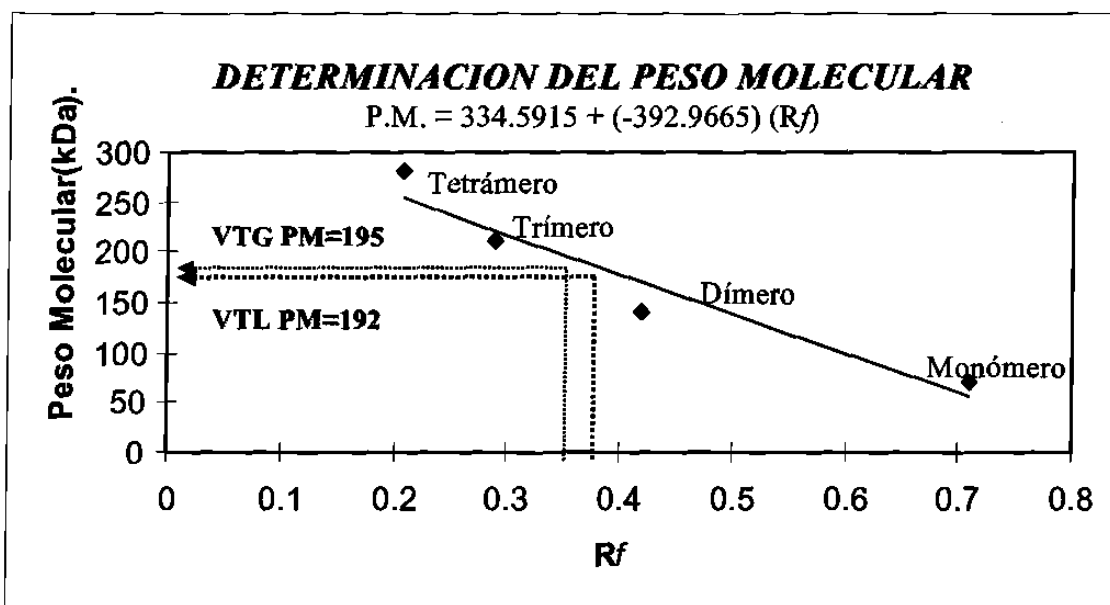


Figura 15.- Estimación del peso molecular de la VTG y VTL mediante el análisis de regresión lineal de los valores de R_f obtenidos por Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Tabla No. 5. Valores obtenidos en el análisis de regresión lineal para la determinación del peso molecular de la VTG y VTL.

Proteína	Peso molecular (kDa.)	Distancia de la molécula (cm.)	Frente (cm.)	R _f
Tetrámero de Hemocianina	280,000	8.53	12.01	0.7102
Trímero de Hemocianina	210,000	5.02	12.01	0.4179
Dímero de Hemocianina	140,000	3.48	12.01	0.2897
Monómero de Hemocianina	70,000	2.48	12.01	0.2064
VTG	195,204	4.26	12.01	0.3547
VTL	192,914	4.33	12.01	0.3605

IX.- DISCUSION

IX.1.-Evaluación gonádica de hembras.

Rodríguez, (1992) menciona con respecto al método directo de monitoreo ovárico por canulación, que en la mayoría de los peces óseos, el ovario se continúa con el oviducto, condición conocida como cistoaria, en donde los óvulos pasan directamente del ovario al poro genital a través del oviducto. Sin embargo, en algunos grupos de peces los oviductos están ausentes o bien, se encuentran reducidos en su extremo, por lo que los óvulos irrumpen en la cavidad del cuerpo y encuentran su salida a través de poros adyacentes a la abertura urinaria y rectal. En este caso los poros se abren cuando ocurre la reproducción, a este tipo de ovario se le conoce como condición condrictina o ginoaria; tal es el caso del género *Atractosteus*, a esto puede contribuir el hecho de que en las hembras las gónadas se encuentren desfasadas, *i.e.*, la derecha se encuentra situada de manera anterior a las aletas pélvicas y la izquierda en situación posterior a éstas. Los oviductos izquierdo y derecho se reúnen en los ductos urinarios correspondientes. Existe una pequeña cámara común formada por la unión de ambos ductos, de esta manera los productos de ambos sistemas salen a través de un sinus urogenital único (Suttkus, 1963), por lo cual resultó imposible la aplicación del método de canulación en *Atractosteus*. Ante esta situación, las determinaciones bioquímicas (esteroides, gonadotropinas, VTG y VTL) representan una alternativa no solo confiable, sino altamente sensible, ya que permiten monitorear y caracterizar proteínas como la VTG plasmática, la cual resulta ser un indicador directo del grado de madurez gonádica de las hembras, además de contar con la ventaja de tratarse de un método no invasivo, ya que no requiere del sacrificio de los ejemplares como es el caso de los métodos convencionales (histológicos), puesto que solo se necesita la extracción de una cantidad mínima de plasma para su realización. No obstante, para poder llevar a cabo su estimación cuantitativa primeramente fue necesario llevar a cabo la purificación de la molécula de VTG plasmática.

IX.2.- Inducción con 17 β -estradiol.

Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los peces el efecto de los estrógenos (17 β -estradiol) es bien conocido, pues se sabe que estimulan directamente al hígado para que éste inicie la síntesis de Vitelogenina (Rodríguez, 1992).

La primera fase de la vitelogénesis en peces comprende la inducción de la producción de VTG hepática bajo la estimulación de los estrógenos ováricos, de entre los cuales el más potente es el Estradiol (Ho, 1987; Barrington and Barker, 1968), aunque se ha visto que la estrona y un andrógeno, la testosterona, pueden también inducir la síntesis de VTG, aunque en menor grado (Ng e Idler, 1983). Por otra parte, en los machos, la síntesis de VTG no puede ser estimulada por la administración de extractos de pituitaria, indicando dos propiedades específicas de la respuesta vitelogénica en peces: con respecto a la vitelogénesis exógena, el hígado no es el órgano blanco para las hormonas pituitarias, además de que en los machos, el proceso de vitelogénesis depende específicamente de la administración directa de estrógenos (Sundararaj *et al*, 1982; Whitehead *et al*, 1983; Sumpter *et al*, 1984; Babin, 1986; Ho, 1987; Olin and Von Der Decken, 1987; Zanuy & Carrillo, 1987; Mommsen and Walsh, 1988; Pelissero and Le Menn, 1988; Pelissero *et al*, 1991; Rincharad *et al*, 1997; Heppell and Sullivan, 1999; Lee *et al*, 1999; Flammarion *et al*, 2000; Lee *et al*, 2000; Shimizu *et al*, 2000) debido a la inhabilidad de la gónada para producir estrógenos (Idler and Campbell, 1980) quedando así de manifiesto la importancia de las células foliculares para la generación de estrógenos. En el mismo sentido, Van Bohemen *et al*, (1982) demostraron el efecto del 17 β -estradiol en la inducción a la vitelogénesis en hembras de *Salmo gairdneri* ovariectomizadas, mientras que Heppell and Sullivan (1999), confirmaron el mismo efecto en hembras inmaduras de *Mycteroperca microlepis*. De igual forma, Hara *et al*. (1984) mencionan que tanto machos como hembras inmaduras pueden ser inducidas al proceso de vitelogénesis mediante el tratamiento con estrógenos, (tomado de Fujita *et al*, 1998).

En nuestra investigación, mediante los experimentos en los cuales los machos fueron inyectados con 17 β -estradiol permitieron verificar la inducción de la VTG por los estrógenos, una característica de la VTG de los vertebrados observada igualmente por Mommsen and Walsh (1988); misma que se aprecia en la **figura No. 3**, en donde se puede observar el incremento de la

concentración de VTG en la fracción N^o. 52. De la misma manera, esto se confirma mediante los resultados obtenidos en los controles (**figura No. 2**) en donde es notable la ausencia del pico proteico en dicha fracción, al igual que en la **figura No. 4** en la que se hace una comparación de los ejemplares tratados con 17 β -estradiol y los controles.

IX.3.-Purificación de la VTG y VTL.

Hasta el momento, numerosos autores han recurrido al uso de diversas técnicas de purificación de la VTG plasmática y VTL ovárica de diferentes organismos acuáticos como son la ultracentrifugación, técnicas cromatográficas, técnicas inmunológicas, electroforesis, entre otras, en las cuales en ocasiones se adiciona una etapa de separación inicial basada en la precipitación de las proteínas mediante el empleo de diversas sales “salting out” (Wiley *et al.*, 1978; De Vlaming *et al.*, 1980; Norberg & Haux, 1988). Sobre este aspecto, Wiley *et al.*, (1978) mencionan que al adicionar cationes divalentes a soluciones de VTG purificada se logra la precipitación de la proteína. La importancia de utilizar esta técnica cuando se pretende lograr la separación de mezclas de proteínas radica en que las proteínas responden de diferente manera frente a la adición de diversas concentraciones de sales neutras.

Algunos investigadores han recurrido al método de ultracentrifugación para precipitar proteínas como la VTG, sin embargo, requiere del uso de una ultracentrífuga de buena resolución, además de un muy alto título de VTG en el suero para producir buenos resultados y aún así, cuenta con la desventaja de que las preparaciones de VTG obtenidas de esta manera están contaminadas con otras proteínas del suero, a diferencia del uso de sales, con las que se obtienen proteínas con un grado de pureza de hasta un 99% (Wiley *et al.*, 1978). Dentro de las sales más comúnmente utilizadas para precipitar proteínas destacan el (NH₄)₂ SO₄ (sulfato de amonio), utilizado para separar y concentrar prácticamente cualquier proteína en solución (Janson *et al.*, 1989) y el MgCl₂ (cloruro de magnesio), debido a su alta solubilidad en agua, lo que les permite alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas; además del agente quelante EDTA (Etilen- diamino-tetra-acético). Lehninger, (1979) menciona que la ventaja de utilizar este método es que las proteínas conservan su conformación nativa y pueden disolverse nuevamente sin experimentar desnaturalización. Existen estudios en los que se han aplicado combinaciones de compuestos con distintas cargas iónicas para lograr la precipitación de proteínas, tal es el caso

de la mezcla EDTA- $MgCl_2$, utilizada habitualmente para purificar la VTG de vertebrados, incluyendo peces, así como de algunos crustáceos (Wiley *et al.*, 1978; De Vlaming *et al.*, 1980; Norberg & Haux, 1988; Mendoza, 1987). A este respecto, Wiley *et al.*, (1978) advierten que al adicionar EDTA en presencia de iones divalentes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Fe^{2+} en una muestra de plasma, se obtiene como resultado la precipitación de la VTG.

En el presente estudio se realizó la técnica de precipitación como una etapa inicial de la purificación de VTG de las muestras de plasma de hembras maduras y de machos inducidos con 17β -estradiol, así como de la Lipovitelina contenida en los extractos de gónadas de hembras maduras de pejelagarto utilizando una mezcla de EDTA- $MgCl_2$, obteniendo con ello muestras de VTG más puras, eliminando las proteínas contaminantes del plasma, como se puede observar en la **figura No. 5**, al igual que para el caso de la VTL en la **figura No. 6**, en las cuales solamente se aprecia la presencia de un pico proteico en la fracción No. 52. Tal parece que las cargas que se encuentran en la superficie de la proteína, que están implicadas en la precipitación, están ligadas a la presencia de los grupos fosfatos, abundantes en la VTG de los peces (Campbell & Idler, 1980; Nath & Sundararaj, 1981; Norberg & Haux, 1988).

Debido a la necesidad de obtener VTG altamente pura, muchos autores han recurrido a la implementación de combinaciones de técnicas de purificación, destacando la Cromatografía de Exclusión Molecular y de Intercambio de Iones (Norberg & Haux, 1985; Copeland *et al.*, 1986; Hamazaki *et al.*, 1987; Copeland & Thomas, 1988; Norberg & Haux, 1988; Tyler & Sumpter, 1990; Chan *et al.*, 1991; Pelissero *et al.*, 1991; Tyler & Lancaster, 1993; Mañanós *et al.*, 1994; Heppel & Sullivan, 1999; Matsubara *et al.*, 1999). Las técnicas cromatográficas han sido ampliamente utilizadas ya que ofrecen la ventaja de disponer de las moléculas de interés, (en este caso la VTG) en fase líquida, lo cual permite continuar con su ulterior purificación por medio de diversas técnicas como la Cromatografía de Afinidad, electroforesis, etc., así como su caracterización posterior.

En esta investigación se logró la purificación de la VTG plasmática y de la VTL ovárica mediante las técnicas cromatográficas de Exclusión Molecular y de Intercambio de Iones. Cabe mencionar que para obtener una mejor separación de las moléculas se utilizó una columna de gran tamaño (26 mm x 70 cm).

Una de las matrices cromatográficas utilizadas en la técnica de Filtración en gel que ha dado los mejores resultados en la purificación de VTG de peces es la Sepharosa-6B (Copeland *et al.*, 1986; Copeland & Thomas, 1988; Tyler & Sumpter, 1990; Pelissero *et al.*, 1991; Tyler & Lancaster, 1993; Mañanós *et al.*, 1994). Esta matriz se caracteriza por poseer una alta capacidad y estabilidad química, ya que puede ser utilizada en un amplio rango de pH, en solventes orgánicos polares y en soluciones de detergentes no iónicos, lo cual facilita su mantenimiento, además de soportar temperaturas extremas. Posee un alto poder de resolución y puede alcanzar tasas de flujo muy altas, lo cual nos brinda la ventaja de procesar una mayor cantidad de muestras en un tiempo menor (Pharmacia Biotech, 1999). Tomando en cuenta que en todos los tipos de Cromatografía, la máxima resolución se obtiene a tasas de flujo bajas, decidimos seleccionar la que nos ofreciera tanto una separación rápida como una alta resolución, por lo que elegimos una tasa de flujo de 1 mL/min como la más conveniente. No obstante, para lograr una buena resolución no solo es importante elegir una tasa de flujo apropiada, sino también un buffer de elución que nos permita una separación exitosa. En estudios similares algunos autores utilizaron con buenos resultados un buffer de fosfatos para eluir las muestras que contenían VTG (Hamazaki *et al.*, 1987; Tyler & Sumpter, 1990). Sin embargo, en nuestro estudio no resultaba conveniente el uso de un buffer de fosfatos, ya que en la posterior etapa de caracterización de la molécula de VTG, el fósforo contenido en el buffer interferiría en las pruebas de determinación de fósforo contenido en la molécula, por lo que se optó por el uso de un buffer Tris-HCl siguiendo los modelos de purificación propuestos por Copeland & Thomas, 1988; Norberg & Haux, 1988; Chan *et al.*, 1991; Mañanós *et al.*, 1994. Aunado a estas modificaciones, fue necesario agregar algunas sales al buffer debido a que la molécula de VTG se retenía en el gel y no obteníamos una elución rápida, por lo que añadimos NaCl 1% y MgCl₂ 1mM al buffer de elución siguiendo la técnica de separación realizada por Copeland & Thomas, 1988, (**figura No. 7**).

Por otra parte, el Intercambio Iónico es la técnica cromatográfica más frecuentemente utilizada para la separación y purificación de proteínas. La amplia aplicación del Intercambio de Iones es su flexibilidad, su gran poder de resolución, su alta capacidad y la simplicidad y controlabilidad del método. La separación en Cromatografía de Intercambio de Iones depende de la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas, inmovilizadas por grupos de intercambio

iónico de cargas opuestas. Estas interacciones pueden ser controladas por algunas condiciones tales como la fuerza iónica y el pH.

La naturaleza de la matriz cromatográfica puede ser a base de compuestos inorgánicos, resinas sintéticas o polisacáridos. Las características de la matriz determinan directamente las propiedades cromatográficas tales como la eficiencia, la capacidad, la estabilidad química, la fuerza mecánica y las propiedades de flujo. La naturaleza de la matriz además afecta el comportamiento de las sustancias biológicas y el mantenimiento de su actividad biológica. (Pharmacia Biotech, 1999).

Numerosos autores han utilizado con éxito el intercambiador iónico de DEAE-Sephacel para lograr la purificación de VTG de peces (Norberg & Haux, 1985; Hamazaki *et al.*, 1987; Norberg & Haux, 1988; Tyler & Sumpter, 1990; Chan *et al.*, 1991; Tyler & Lancaster, 1993) debido a que presenta una gran estabilidad química en suspensiones acuosas en un amplio rango de pH (de 2 a 12). Sin embargo, tanto en presencia de soluciones fuertemente ácidas como en soluciones extremadamente alcalinas es inherentemente inestable. En cuanto a su capacidad, posee un límite de exclusión para proteínas con pesos moleculares de aproximadamente 1×10^6 Daltons. En relación a la tasa de flujo óptima, la máxima resolución se obtiene a tasas de flujo bajas, como se mencionó anteriormente. Tomando en cuenta todas estas consideraciones, en nuestro estudio se utilizó la matriz DEAE-Sephacel con un buffer Tris-HCl, pH 8 a una tasa de flujo de 0.3mL/min para obtener una mejor resolución. En cuanto al gradiente lineal de KCl utilizado (de 0 a 0.5M), notamos que casi inmediatamente apareció el pico de VTG (**figura No. 7**).

Es preciso notar que el perfil de elución de las proteínas después de su paso por la columna cromatográfica de Intercambio de Iones (**figura No. 8**) muestra que la etapa de Filtración en gel (**figuras No. 3 y 6**) no resultaba suficiente en sí, ya que otras proteínas plasmáticas con un peso molecular equivalente eran eluidas al mismo tiempo que la VTG. Sin embargo, la carga de la VTG a pH 8 permitió separarla. Con este protocolo de purificación se logró la obtención de una fracción de VTG a partir del plasma de machos inducidos con 17β -estradiol, y de la VTL a partir de un extracto de gónada de hembra madura, cuya pureza y las principales propiedades pudieron ser constatadas. La pureza de ambas moléculas aisladas en el transcurso de esta investigación pudo demostrarse con la obtención de un solo pico al finalizar el paso de las muestras a través de la columna de Intercambio de Iones. Después de este proceso, la

naturaleza de la molécula de VTG fue confirmada mediante las diferentes pruebas de caracterización a las que fue sometida.

Por otra parte, tomando en cuenta que la VTG y la VTL son moléculas no solo muy similares, sino inmunológicamente indistinguibles, se asumió, a raíz de lo anterior, que la presencia de una fracción con características similares a las de la VTG en el cromatograma del extracto de gónada de hembra madura, correspondía a la VTL (**figura No. 7**).

IX.4.-Caracterización de la VTG y VTL.

La caracterización de ambas moléculas fue una parte esencial en este estudio, y consistió en una serie de pruebas que involucraron la detección de los diferentes grupos prostéticos asociados a dichas proteínas, así como la determinación de sus respectivos pesos moleculares.

a) Caracterización en base a sus grupos prostéticos.

Las moléculas de VTG y VTL obtenidas mediante los diferentes procesos de purificación empleados anteriormente, se caracterizaron en base a su naturaleza química, lo cual nos permitió identificarlas como las proteínas buscadas en este estudio.

Debido a que es conocido que los ovocitos de los peces contienen varios productos secundarios en su composición química tales como los carotenoides (principalmente astaxantina), mismos que corresponden aproximadamente al 1% del peso fresco del ovocito (Mommensen and Walsh, 1988), la primera fase de la caracterización consistió en la determinación de su presencia en cada una de las fracciones obtenidas mediante las técnicas espectrofotométricas antes descritas. Inicialmente, considerando la anatomía interna de las gónadas de hembras, para la cual se mencionan los cambios en su coloración de acuerdo al grado de desarrollo, tornándose en un color verde olivo en etapa de maduración y justo antes del desove (Netch y Witt, 1962; Resendez y Salvadores, 1983; Pérez-Sánchez, 1995), se realizó un barrido de un extracto de gónada de hembra madura (color verde olivo) en el espectrofotómetro, lo que permitió obtener un pico de Absorbancia máximo a una longitud de onda de 409 nm. Esta Absorbancia fue utilizada para la lectura de las fracciones obtenidas en la etapa de purificación; así, en la **figura No. 11** pudimos observar claramente la presencia de los carotenoides en el pico proteico localizado en la fracción

No. 52. A este respecto, Mommsen and Walsh (1988) mencionan que los carotenoides pueden formar parte de la molécula de VTG por sí mismos en el ovario o, alternativamente pueden viajar en la sangre unidos a las abundantes lipoproteínas, especialmente a las de muy baja densidad.

Por otra parte, se sabe que en el curso de la vitelogenénesis exógena, los ovocitos de los teleósteos acumulan grandes cantidades de lípidos adicionales a los lípidos polares liberados como parte de la molécula de VTG (Mommsen and Walsh, 1988). Asimismo, se menciona que arriba del 80% de los lípidos vitelogenéticos son fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina, seguido de triglicéridos, ácidos grasos libres, ésteres de colesterol y colesterol (Norberg and Haux, 1985; Mommsen and Walsh, 1988; Lund *et al*, 2000). Considerando este contexto, se realizó la determinación del material lipídico presente en las fracciones obtenidas por cromatografía para caracterizar la molécula de VTG, y así se pudo observar que los lípidos se hicieron presentes solamente en el pico localizado entre las fracciones 45-59, con su máxima concentración en la fracción No. 52 (**figura No. 9**), por lo que esta prueba resultó ser crucial para la caracterización de la VTG, ya que el otro pico proteico que aparecía en los cromatogramas carecía de contenido lipídico.

Otra prueba crucial en la caracterización de la molécula de VTG fue la detección de carbohidratos presentes en las fracciones, ya que se sabe que los ovocitos de los peces están constituidos por residuos de carbohidratos unidos a las proteínas, cuya composición es muy variable, principalmente N-acetilglucosamina, seguido por el ácido N-acetilneuramínico, N-acetilgalactosamina, fucosa, galactosa y manosa (Mommsen and Walsh, 1988). En este caso fue evidente la presencia de un pico cuya máxima concentración se encontró en la fracción No. 52, correspondiente a los residuos de carbohidratos contenidos en la molécula de VTG. (**figura No. 13**).

Para finalizar la caracterización de la molécula de VTG, se corroboró la presencia de fósforo en las fracciones de plasma, cabe mencionar que el fósforo se encontraba presente de manera proporcional en cada uno de los picos proteicos obtenidos por cromatografía (**figura No. 12**). Lo anterior es acorde a las observaciones realizadas por Rinchar *et al*, (1997), quienes indican que los cambios que ocurren en las concentraciones de fosfoproteínas son paralelos a la

maduración, asimismo, afirman que esta medición resulta ser un indicativo confiable de la presencia de VTG en plasma. Sin embargo, advierten que la interpretación cuantitativa debe hacerse cuidadosamente, ya que la VTG puede existir con diferentes grados de fosforilación. A este respecto, pudimos constatar que se trata de una prueba sumamente sensible y que su realización requiere de un manejo muy delicado.

b) Caracterización en base al rol fisiológico de las moléculas.

Adicionalmente, al analizar de manera comparativa los cromatogramas del plasma de macho inducido con 17β -estradiol, así como del control precipitado y del extracto de gónada de hembra madura (**figura No. 7**), se observó la ausencia del pico proteico en la fracción No. 52 del control precipitado, confirmando de esta forma que esta fracción se presentaba exclusivamente en hembras maduras y machos inducidos. Por lo cual, es posible considerar que esta fracción corresponde a la molécula de VTG plasmática y VTL ovárica, ya que ambas moléculas son características solo de las hembras y únicamente se presentan en el estado reproductivo, marcando así el inicio de la pubertad (Mommssen and Walsh, 1988).

IX.5.-Determinación del Peso Molecular.

Para determinar el peso molecular de la VTG y VTL, primeramente se analizaron los resultados obtenidos en el corrimiento electroforético de las diferentes muestras con sus controles (**Figura No. 6**), en donde claramente se observa la presencia de una banda suficientemente visible en los carriles No. 6, 9 y 10, correspondientes a la VTG y probablemente a otras proteínas que comparten el mismo rango de peso molecular. Comparando los carriles No. 6 y 9 pudimos percatarnos de que en el No. 6 se observa una mayor cantidad de bandas, esto debido a que la muestra no siguió un proceso de precipitación como en el caso de la muestra del carril No. 9, en la que por consecuencia se observa una menor cantidad de bandas.

En el carril No. 8, perteneciente a una muestra de gónada, se observó la presencia de una banda igualmente visible correspondiente a la VTL, mientras que en el carril No. 10, que contenía la muestra obtenida de la purificación del plasma por Cromatografía, observamos una banda menos prominente que las anteriores, que correspondía a la VTG. Estas bandas están ausentes en los controles de los carriles No. 3 y 7, además de los carriles No. 4 y 5, que contenían el plasma

degradado. Así, la técnica de SDS-PAGE confirmó que la VTG está normalmente presente sólo en hembras maduras y machos inducidos, como lo explican numerosos estudios sobre la VTG en peces y otros vertebrados.

Una vez ubicadas las moléculas de VTG y VTL en el gel de Electroforesis, se procedió a la estimación de sus pesos moleculares por medio de un análisis de regresión lineal de los valores de R_f obtenidos para ambas moléculas, encontrando un peso molecular de 195.2 kDa. para la VTG y de 192.9 kDa. para la VTL. Es interesante notar que estos valores resultan cercanos al de 183 kDa. Determinados en el caso de la VTG de *Mycteroperca microlepis*, estimados mediante SDS-PAGE, (Heppell & Sullivan, 1999). Sin embargo, estos valores resultan bajos si los comparamos con los rangos de peso molecular reportados para la VTG de diferentes teleosteos por otros investigadores, que van desde los 326 a 600 kDa. (Tabla No. 1). No obstante, en la misma tabla observamos valores cercanos a los obtenidos en esta investigación reportados para sub-unidades de VTG de algunos teleosteos, utilizando la técnica de SDS-PAGE; lo que nos podría llevar a suponer que la fracción obtenida se tratara solo de una sub-unidad de la VTG, lo que confirma la degradación de una sub-unidad (pérdida de un monómero del dímero que se presenta normalmente durante el proceso. A este respecto, Matsubara *et al.*, (1999) reportan dos sub-unidades de VTG y de VTL mediante técnicas inmunológicas y de Electroforesis en *Verasper moseri*, (un teleosteo marino), que juegan diferentes papeles durante el proceso de maduración ovocitaria y el desarrollo de esta especie. Por otra parte, el gran número de sub-unidades reportado para estas moléculas en diferentes especies de teleosteos bajo condiciones desnaturalizantes aún es objeto de controversia.

Un aspecto notable, observado durante este estudio es que los resultados obtenidos indican que la VTG presenta un peso molecular más elevado en comparación con la VTL. Cabe mencionar que la diferencia encontrada en los pesos moleculares de ambas moléculas no se atribuye a una posible desnaturalización de éstas durante los procesos de purificación a los que fueron sometidas, considerando que ambas moléculas fueron purificadas mediante las mismas técnicas y tomando la precaución de trabajar a bajas temperaturas y en presencia del inhibidor enzimático (PMSF) con el fin de evitar cualquier tipo de degradación. Esta ligera diferencia de peso molecular indicaría que la VTG efectivamente es el precursor de la VTL, siendo sintetizada en el hígado, bajo la estimulación de estrógenos producidos en el ovario, posteriormente secretada a la circulación y transportada al ovario, en donde es incorporada dentro de los ovocitos

por un proceso de micropinocitosis mediado por receptores, y una vez en los ovocitos sería procesada enzimáticamente, lo que explicaría el menor peso molecular de la VTL. (Campbell & Idler, 1980; Nath & Sundararaj, 1981; Ng & Idler, 1983; Ho, 1987; Zamuy & Carrillo, 1987; Mommsen & Walsh, 1988; Norberg & haux, 1988).

X.- CONCLUSION

Las proteínas aisladas en este estudio pueden ser consideradas como las sub-unidades de las moléculas de VTG y VTL de la especie *Atractosteus tropicus*, ya que cumplen con todas las características típicamente asociadas con las mismas.

Por otra parte, las técnicas utilizadas para lograr tanto la purificación como la caracterización resultaron adecuadas en este estudio y servirán como referencia para ser comparadas con las de *Atractosteus spatula*.

XI.- LITERATURA

- ALEMAN, L.** (1987). Algunas consideraciones ecológicas sobre el pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y descripción de sus hábitos alimenticios. Memorias del IX Congreso Nacional de Zoología. 13-16 de Octubre. Tabasco, México. pp. 56.
- ALLEN, R. C. and B. BUDOWLE.** (1994). Gel electroforesis of proteins and nucleic acids; Selected techniques. *Walter de Gruyter, Berlin, New York*; 210-211.
- ALVAREZ, J.** (1970). Peces mexicanos (claves). *Secretaría de Industria y Comercio. Instituto de Investigaciones Biológicas Pesqueras.*
- BABIN, P. J.** (1986). Effect of plasma lipoproteins in gonadotropin stimulation of 17 β -Estradiol production in the ovarian follicle of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology*; 64: 456-467.
- BALESTRA, M., E.A. FERRERO; P.G. GIULIANI and R. ARZARI.** (1991). Immunological characterization and quantitation of yolk proteins during sexual maturation of *Zosterisessor ophiocephalus* (Pisces: Gobiidae). *Aquaculture Europe '91*; 10-12.
- BARRINGTON, E. and J. C. BARKER** (1968). Perspectives in Endocrinology: Hormones in the lives of lower vertebrates. Academic Press, N. Y., pp. 217-219.
- BEJERANO, G., G. MARQUEZ y S. PARAMO.** (1997). Propuesta metodológica para la inducción al desove del pejelagarto *Atractosteus spatula*. Memoria de la Semana de divulgación y video científico 1997. Secretaría de Servicios Académicos. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. pp. 80-83.
- 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.
- BIDWELL, CH. A., K. J. KROLL; E. SEVERUD; S. I. DOROSHOV and D. M. CARLSON.** (1991). Identification and preliminary characterization of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) vitellogenin mRNA. *General and Comparative Endocrinology*; 83: 415-424.
- BRADFORD, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72; 248-254.

149285

- BREDER, C. and D. E. ROSEN.**-(1996). Modes of production in fishes. The American Museum of Natural History. Natural History Press, Garden City, New York. pp. 68-69.
- 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.
- CAROLSFELD, J., S. M. RAMOS, R. ORMANEZI, J. H. GOMES, J. M. BARBOSA and B. HARVEY.** (1988). Analysis of protocols for application of an LHRL analog for induced final maturation and ovulation of female Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887).
- COLUNGA, T. J.** (1996). Inducción al desove del catán (*Lepisosteus spatula*) mediante la aplicación de Gonadotropina Coriónica Humana (HCG). *Instituto Tecnológico del Mar, SEP; Boca del Río, Ver.*
- CONTRERAS, W. Y L. ALEMÁN.** (1987). Aspectos reproductivos y desarrollo embrionario del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) en el Estado de Tabasco. Memorias del IX Congreso Nacional de Zoología. 13-16 de Octubre. Tabasco, México. pp. 57.
- CUISSIET, B., PELISSERO, C., Le MENN, F. and NUÑEZ- RODRIGUEZ.** (1991). ELISA for siberan 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 an assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1766). *The Journal of Experimental Zoology*; 257: 96-109.
- CHAVES-LOMELI, M., A. E. MATTHEWS y M. PEREZ-VEGA** (1989). Biología de los peces del río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura. INIREB FUCID, Xalapa, Veracruz, Méx. 19-29.
- DEAN, B.** (1895). The early development of gar-pike and sturgeon. *Journal of Morphology*; 11(1): 1-53.
- De VLAMING L. V., G. GROSSMAN and F. CHAPMAN.** (1982). On the use of the gonadosomatic index, *Comp. Biochem. Physiol.*, 73A: 31-39.

- 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.
- FISKE, C. and Y. SUBBARROW.** (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*; 66: 375-400.
- FLAMMARION, P.; BRION, F.; BABUT, M.; GARRIC, J.; MIGEON, B.; NOURY, P. and E. THYBAUD.** (2000). Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: preliminary results of estrogenic effects in Chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology*, 9: 127-135.
- 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.
- GOMEZ-GOMEZ, M.** (1989). Reproducción del pejelagarto en estanquería rústica. Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el Estado de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. Marzo, 1989. pp. 13-14.
- HEPPELL, S. A. and C. V. SULLIVAN** (1999). Gar (*Myxteroperca 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.
- HICKEY, E. D. and R. A. WALLACE** (1974). A study of the vitellogenic protein in the serum of estrogen-treated *Ictalurus nebulosus*. *Biology Bulletin (Woods Hole, Mass)*; 147, 181 pp.
- HIROSE, K, AND R. ISHIDA** (1974). Effects of cortisol and human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation in ayu *Plecoglossus altivelis* (Temminck and Schlegel) with special respect to water and ion balance. *Journal of Fish Biology*, 6: 557-564.
- 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.
- HOLLOWAY, A.** (1954). Notes on the life history and management of the shortnose and longnose gars in Florida waters. *Journal of Wildlife Management*. 18(4): 440-449.

- IDLER, D.R.; S. J. HWANG and L. W. CRIM.** (1979). Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *Journal Fish Res. Board Can.*; 36: 574-579.
- JALABERT, B.** (1976). In vitro oocyte and maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*), Northern Pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Crassius auratus*). *J. Fish. Res. Board Can.*; 33: 974-988.
- JANSON, JAN-CHRISTER & R. LARS.** (1989). Protein purification; principles high resolution methods and applications. *VCH Publishers, Inc.* 502 pp.
- KANUNGO, J.; T. R. PETRINO 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.
- 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., MATSUMOTO AND, W. and S. HAYASHI.** (1996). Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B (3): 561-571.
- LaFLEUR, G. J.; B. M. BYRNE; J. KANUNGO, L. D. NELSON; R. M. GREENBERG 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.
- 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.
- LE BAIL, P. Y. and B. BRETON.** (1981). Rapid determination of the sex of puberal salmonid fish by technique of immunoagglutination. *Aquaculture*; 22: 367-375.
- LEE, Y. H.; DU, J. L.; YUEH, W. S.; LEE, F. Y.; TANAKA, H. and C. F. CHANG.** (1999). 17 β -Estradiol, but not testosterone stimulates gonadotropin II concentrations in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21: 345-351.

- LEE, Y-H.; LEE, F-Y.; YUEH, W-S.; TACON, F.; DU, J-L.; CHANG, CH-N.; JENG, mS-R.; TANAKA, H. and CH-F CHANG.** (2000). Profiles of gonadal development, sex steroids, aromatase activity, and gonadotropin II in the controlled sex change of protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker. *General and Comparative Endocrinology*; 119: 111-120.
- LEHNINGER, A. L.** (1979). Bioquímica; bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. Editorial OMEGA, S. A. Pp. 166-167.
- LEON, R. R.; AGUILAR y Y. HERNANDEZ.** (1978). Estudio sobre la biología y el cultivo artificial del manjuari (*Atractosteus tristoechus*) Bloch and Schneider. *Acuicultura. Ministerio de la Industria Pesquera de Cuba, Dir. Ramal de Acuicultura. INVESTIGACS.* 35 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.
- LUND, E.D.; SULLIVAN, C. V. and A. R. PLACE.** (2000). Annual cycle of plasma lipids in captive reared striped bass: effects of environmental conditions and reproductive cycle. *Fish Physiology and Biochemistry*; 22: 263-275.
- MARQUEZ, P. H.** (1998). Efectos de la temperatura en el desarrollo de embriones y en el crecimiento de larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus* bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. 43p.
- 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.; N. OHKUBO; T. ANDOH; C. V. SULLIVAN and A. HARA.** (1999). Two forms of Vitellogenin, yielding two distinct Lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of Barfin Flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Developmental Biology.* 213: 18-32.
- MENDOZA, A. E. MENDOZA, S. PARAMO, W. CONTRERAS y G. MARQUEZ** (1993). Alternativas de desarrollo piscícola para el manejo de áreas inundadas. Tabasco: Realidad y Perspectivas. Tomo III. Economía y Desarrollo. Gobierno del Estado de Tabasco. Editorial Porrúa. pp. 263-303.

- MENDOZA, R.** (1987). Caractérisation des stades de maturation d'une crevette péneide (*Penaeus vannamei*): évolution biochimique de l'hémolymphe. D.E.A. d'Océanologie Biologique, Université de Bretagne Occidentale. 29 pp.
- MENDOZA, R.; C. AGUILERA y J. MONTEMAYOR.** (1998). El cultivo de catán (*Atractosteus spatula*) en México. *Dirección Nacional de Investigación en Acuicultura del Instituto Nacional de Pesca, México.*
- 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: *4ª Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura, INP-SEMARNAP.* Alvarez Torres, P. (ed)., 281-291.
- 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*) (Lacepede, 1803). In: *4ª Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura, INP-SEMARNAP.* Alvarez Torres, P. (ed)., 103-121.
- 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. *SEPES. Dirección General de Acuicultura.* pp. 41-70.
- NAGAHAMA, Y.** (1987). Endocrine control of oocyte maturation. *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles.* Norris D. O. and Jones R. E. (eds). Plenum Press, N. Y.; 171-203 pp.
- NAGAHAMA, Y.** (1990). Endocrine control of oocyte maturation in teleosts. *Progress in Comparative Endocrinology;* 385-392. pp.
- NAGLER, J. J.; D. R. IDLER and YING P. S.** (1992). A comparison of tritiated vitellogenins prepared by *in vivo* and *in vitro* techniques for studies of ovarian uptake in fish. *The Journal of Experimental Zoology;* 264: 107-112.
- NAGLER, J. J.; CH. R. TYLER and J. P. SUMPTER.**(1994). Ovarian follicles of rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) cultured within lamellae survive well, and sequester and process vitellogenin. *The Journal of Experimental Zoology;* 269: 45-52.

- NETCH, N. F. and A. WITT.** (1962). Contributions to life history of the longnose (*Lepisosteus osseus*) in Missouri. *Missouri Wildlife Research Unit: U. S. Fish and Service*; 251-262. pp.
- NG, T. B. and D. R. IDLER.** (1983). Yolk formation and differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology*; IX: 373-404.
- NORBERG, B. and C. HAUX.** (1985). Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two salmo species: rainbow trout, (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemical Physiology*; 81B: 869-876.
- NUÑEZ, J.; E. BON and F. LE MENN.** (1996). Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Zoology*; 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.
- ORDAZ, M. Y.** (1992). Mecanismos de retroalimentación del eje cerebro-hipófisis-gónada en peces. *Temas actuales sobre reproducción de teleósteos*; 7-12 pp.
- ORTIZ, J.** (1998). Red trófica del catán *Atractosteus spatula* primera parte: identificación de presas naturales para su cultivo. *Centro Regional de Investigaciones Pesqueras Tampico, Tamaulipas*; 3 pp.
- PELISSERO, C. and F. LE MENN.** (1988). Détermination des taux plasmatiques de stéroïdes sexuels et de la vitellogénine chez l'esturgeon sibérien *Acipenser baeri* élevé en pisciculture. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 307, Série III, p. 749-754.
- 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.
- PEREZ-SANCHEZ, E.** (1995). Efecto de la Gonadotropina Coriónica Humana (GCH) en la maduración gonádica del pejelagarto (*Atractosteus tropicus* Gill, 1823) en condiciones de laboratorio. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. pp. 46.
- PEREZ-SANCHEZ, E. y S. PARAMO.** (1998). Estudio histológico de las gónadas de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae). *Universidad y Ciencia*. 14(27): 69-82.
- PHARMACIA BIOTECH.** (1999). Gel Filtration; theory and practice. Sixth edition. Pp. 103.

- PHARMACIA BIOTECH.** (1999). Ion Exchange Chromatography. Principles and methods. Edition AA. Pp. 58-60.
- RESENDEZ, A. y M. L. SALVADORES.** (1983). Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* Gunther, del Estado de Tabasco. *Biotica* 8(4): 413-426.
- RIAZI, A. and L. FREMONT.**(1988). Serum vitellogenin and yolk proteolipid complex composition in relation to ovarian growth in rainbow trout *Salmo gairdneri*, (RICH). *Comparative Biochemical Physiology*; 89B: 525-529.
- RINCHARD, J.; KESTEMONT, P. and R. HEINE.** (1997). Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. II. Sex steroid and plasma protein phosphorus concentrations. *Journal of Fish Biology*, 50: 169-180.
- RODRIGUEZ, J., A. BANDA, L. GONZALEZ, J. HERRERA y F. GARCIA** (1998). Evaluación Biológica Pesquera del Catán (*Atractosteus spatula*) en la Presa Vicente Guerrero, Tamaulipas. VI Congreso Nacional de Ictiología. Tuxpam, Veracruz, México. pp: 182.
- RODRIGUEZ, M.** (1992). Evaluación gonádica de parentales para la inducción a la reproducción. *Temas actuales sobre reproducción de teleósteos*; 25-29 pp.
- RODRIGUEZ, M.** (1992). Mecanismos de retroalimentación del eje cerebro-hipófisis-gónada en peces. *Temas actuales sobre reproducción de teleósteos*; 7-10 pp.
- RODRIGUEZ, N. J., BON, E. and F. LE MENN.** (1996). Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Zoology.*, 274: 163-170.
- RODRIGUEZ de la CRUZ, M. C.; M. R. PALACIOS-FEST; R. CRUZ-SANTABALBINA y DIAS.** (1994). Atlas pesquero de México. *SEPES. INP.*
- ROSAS, M.** (1976). Peces dulceacuícolas que se explotan en México y datos sobre su biología. *INP/Subsecretaría de Pesca.*
- SHIMIZU, M.; FUKADA, H.; FUJITA, T.; HIRAMATSU, N. and A. HARA.** (2000). Serum levels of precursors to vitelline envelope proteins (choriogenins) in Sakhalin taimen after treatment with oestrogen and during oocyte growth. *Journal of Fish Biology*, 57: 170-181.

- SIMON, T. and R. WALLUS** (1989). Contributions to the early life histories of gar (Actynopterygii: Lepisosteidae) in the Ohio and Tennessee river basins with emphasis on larval development. *Trans. Ky. Acad. Sci.* 50(1-2): 59-74.
- SPECKER, J. L. and C. V. SULLIANG.** (1994). Vitellogenesis in fish: status and perspectives. *Perspectives in Comparative Endocrinology*; 304-315.
- SUMPTER, J. P.** (1982). The purification and radioimmunoassay of vitellogenin from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Abstract Pap.; International Symposium Comparative Endocrinology*; 9: 11 pp.
- SUMPTER, J. P.; SCOTT, A. P. ; BAYNES, S. M. and P. R. WITTHAMES.** (1984). Early stages of the reproductive cycle in virgin female rainbow trout (*Salmo gairdneri*, RICHARDSON). *World Aquaculture Society*. 43: 235-242.
- SUTTKUS, R. D.** (1963). Order Lepisoste, in fishes of the Western North Atlantic. *Mem. Sears. Foundation Mar. Res.*; 1(3): 630 pp.
- Temas actuales sobre reproducción de teleósteos*; 25-29 pp.
- 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*. *The Journal of Experimental Zoology*; 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, CH. R.; J. P. SUMPTER and N. R. BROMAGE.** (1990). An *in vitro* culture system for studying vitellogenin uptake in to ovarian follicles of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *The Journal of Experimental Zoology*; 255: 216-231.
- TYLER, CH. and P. LANCASTER.** (1993). Isolation and characterization of the receptor for vitellogenin from follicles of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Comparative Physiology B.*; 163: 225-233.
- VAITUKAITIS, J.** (1981). Production of antisera with small doses of immunogen multiple intradermal injections. *Methods in Enzymology*; 73: 46-51.
- 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. A. and K. SELMAN.** (1985). Major changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus heteroclitus* oocytes. *Dev. Biol.*; 110: 492-498.
- WHITEHEAD, C.; BROMAGE, N. R. and BRETON B.** (1983). Changes in serum levels of gonadotropin, 17 β -Estradiol and vitellogenin during the first and subsequent reproductive cycles of female rainbow trout. *Aquaculture*, 34: 317-326.
- WILEY, H. S., OPRESKO, L. and R. 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 pp.

