

1. INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

GENERAL

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

ESPECIFICOS

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

3. ANTECEDENTES

3.1. ROL DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LA REPRODUCCIÓN.

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

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

3.2. CONTROL HORMONAL DE LA REPRODUCCION

3.2.1. *Función de la Hipófisis (Glándula Pituitaria)*

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

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

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

3.2.2. Estructura y Función de las Gónadas.

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

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

Testículos.

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

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

Ovarios.

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

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

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

Esteroides de Origen Gonadal.

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

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

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

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

3.2.3. Gametogénesis:

Espermatogénesis

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

Ovogénesis.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

¹sGnRHa

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

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

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

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

3.5.1 Biología General y Aspectos Ecológicos.

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

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

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

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

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

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

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

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

3.5.2. *Biología de la Reproducción.*

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

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

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

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

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

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

4- MATERIAL Y METODOS

4.1. CAPTURA Y ACLIMATACION DE ORGANISMOS.

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

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

4.2.1. Purificación de Vitelogenina Plasmática.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2.2. Obtención de Anticuerpos Policlonales.

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

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

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

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

4.2.3. Pruebas Cruzadas

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

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

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

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

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

4.2.4. Cuantificación de la Vitelogenina plasmática.

Para la cuantificación de la vitelogenina se empleo la técnica de inmunodifusión radial simple (SRID) (Mancini et al, 1965). Las placas de agarosa al 1 % se prepararon con buffer Tris-Tricina-Lactato de calcio y 0.02% de NaN₃ como bacteriostático. Una vez mezclados, la solución se calentó para disolver la agarosa y cuando la temperatura estaba alrededor de los 45° C, se le agregó suero anti-VTG a razón de 100 uL por cada 100 mL de gel (1:1000). La curva estándar se preparó disolviendo la proteína purificada en buffer Tris-HCl 5 mM, pH 7.3, 150 mM NaCl y 0.02% de NaN₃ para obtener concentraciones desde 0 a 15 µg de VTG; mientras que las muestras de plasma fueron diluidas en el mismo buffer en proporción 1:1. En todos los casos, el volumen de muestra por pozo fue de 5 µL y se realizaron tres repeticiones. El procedimiento para la incubación, tinción y preservación del gel fue el mismo que el empleado en el apartado anterior.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3.3. Preparación de las Inyecciones.

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

4.3.4. Acondicionamiento de los Tanques para el Desove.

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

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

4.3.5. Evaluación de la Respuesta a la Inducción.

Esta consistió en realizar una revisión de los siguientes aspectos:

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

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

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

4.3.6. *Cultivo de Larvas*

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

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

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

4.4. ANALISIS ESTADISTICO.

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

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

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

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

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