

1.- INTRODUCCIÓN	2
2.- ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN PECES TELEÓSTEOS.....	2
2.1 Control hormonal del desarrollo gonadal	2
2.2 Ovogénesis	4
2.3 Espermatogénesis	8
3.- PARÁMETROS DE IMPORTANCIA POBLACIONAL RELACIONADOS CON EL SEXO.....	10
3.1 Proporción de sexos.....	10
3.2 Escala de madurez sexual.....	11
3.3 Índice gonadosomático (IGS).....	11
3.4 Fecundidad	11
4.- IDENTIFICACIÓN DE MACHOS Y HEMBRAS EN SALMÓN.....	12
4.1 Vitelogenina	13
4.2 Método inmunoenzimático mediante ELISA.....	13
5.- MUESTRAS ANALIZADAS.....	15
6.- RESULTADOS EN OTRAS POBLACIONES.....	19
7.- CONCLUSIONES	19
8.- BIBLIOGRAFÍA	20

1.- INTRODUCCIÓN

La determinación de la proporción de sexos y la serie de cambios en la fase de madurez que ocurren durante el año son de enorme importancia para adquirir un conocimiento completo de la biología de una población explotada. En el caso de algunas especies puede ser necesario mantener de forma rutinaria programas para analizar la proporción de sexos y las fases de madurez de los individuos. Por ejemplo, los índices de mortalidad y de crecimiento pueden ser distintos entre los sexos. Además, cuando las capturas de una especie contienen una mezcla de poblaciones, los datos de madurez pueden dar la idea más clara de las proporciones relativas de tales mezclas y de los cambios en las proporciones y pueden ser decisivos en la regulación de la explotación, comercial o recreativa, de los diferentes individuos que la componen.

Por otro lado, las determinaciones de los sexos y de las fases de madurez sexual tienen como aplicación primordial proporcionar conocimientos fundamentales de la biología de la reproducción de una población. La información obtenida de estos análisis puede emplearse para establecer la edad y talla en la que los peces alcanzan la madurez sexual, el momento y lugar de la reproducción y la duración del ciclo desde el comienzo del desarrollo del ovario hasta la puesta de los huevos. Junto con las estimaciones de la fecundidad, esta información puede emplearse para calcular las dimensiones de una población y su potencial reproductivo. Los datos tienen varios usos prácticos. La edad y talla en el momento de la madurez sexual son de importancia para evaluar la edad óptima de la primera captura de una especie y el momento y lugar del desove se pueden emplear para organizar la pesca, ya que muchas especies son más fáciles de pescar cuando se congregan para la reproducción.

2.- ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN PECES TELEÓSTEOS

2.1 Control hormonal del desarrollo gonadal

Los factores del medio ambiente son los responsables de la inducción inicial del desarrollo gonadal, las hormonas producidas por el sistema endocrino son las que controlan éste proceso (Shepherd y Bromage, 1988).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada

Los sistemas nervioso y endocrino de los vertebrados actúan conjuntamente para coordinar los eventos reproductivos de los teleósteos, siendo el eje hipotálamo-hipófisis-gónada el que controla dicho proceso.

El esquema general del control hormonal que ejerce el sistema neuroendocrino sobre el proceso de ovogénesis y espermatogénesis es el siguiente:

Fotoreceptores de la retina o quimiorreceptores del epitelio olfatorio son los encargados de captar y convertir los estímulos ambientales en señales electroquímicas que se dirigen vía neuronas sensoriales al cerebro y de ahí al hipotálamo, donde son procesadas induciendo a la secreción de hormonas peptídicas como GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), en ciertas especies el GRIF (factor inhibidor de la liberación de gonadotropina). Estas hormonas se dirigen a la glándula pituitaria donde inducen y regulan la producción de la hormona GtH (hormona gonadotropina), que luego es liberada al torrente sanguíneo por donde circula hasta llegar a las gónadas, órganos productores de esteroides que son los que directamente controlan el desarrollo gonadal (Fig. 1) (Shepherd y Bromage, 1988; Patiño, 1995).

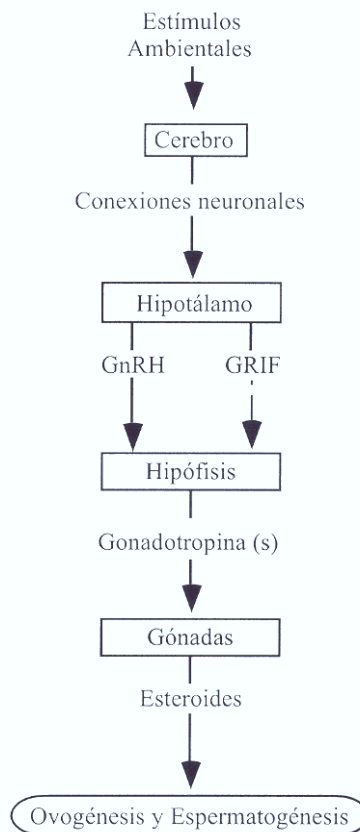


Figura 1. Enlaces neuro-endocrinos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. GnRH hormona liberadora de gonadotropina, GRIF factor inhibidor de la liberación de gonadotropina.

Existen dos tipos de gonadotropinas producidas y secretadas por parte de las células gonadotrópicas localizadas en el *pars distalis proximalis* de la glándula hipofisiaria:

1) Gonadotropina tipo I o vitelogénica que interviene en el proceso de incorporación de vitelo al citoplasma del oocito (Idler y Ng, 1983; Matty, 1985; Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995; Thomas, 1994; Zohar, 1989).

2) Gonadotropina tipo II o maduracional que interviene en el proceso de esteroidogénesis, espermatogénesis, espermiogénesis, espermiación, maduración del oocito y ovulación (Idler y Ng, 1983; Matty, 1985; Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995; Thomas, 1994; Zohar, 1989).

2.2 Ovogénesis

La ovogénesis es el proceso de desarrollo del oocito a partir del cual resulta la más grande de las células que se pueda encontrar en los peces, y que además presenta la particularidad de poder producir un nuevo individuo de la misma especie después de su fertilización (Lagler *et al.*, 1977).

El ovario de las hembras sexualmente inmaduras se encuentra formado principalmente por epitelio germinativo a partir del cual se van a diferenciar las oogonias durante la época de diferenciación sexual (Takashima e Hibiya, 1995). Al alcanzar la época de madurez sexual, el proceso de ovogénesis se inicia con una etapa de proliferación oogonial en el que las oogonias que se encuentran en el ovario sufren dos divisiones mitóticas y una meiótica que se detiene al llegar a la profase, transformándose en oocitos primarios. En ésta etapa los oocitos se encuentran rodeados por una capa de células epiteliales que forman el folículo ovárico (Harvey y Hoar, 1979; Nagahama, 1983; Zohar, 1989).

Posteriormente los oocitos entran en una primera etapa de crecimiento denominada previtelogénesis, en ésta fase los oocitos se caracterizan por un gran núcleo rodeado por numerosos nucleolos, además de la presencia en el citoplasma de una estructura denominada corpúsculo de Balbiani formado por varios organelos celulares tales como mitocondrias, aparatos de Golgi, retículo endoplásmico granuloso, cuerpos multivesiculares, y gránulos de lípidos. En conjunto tienen la función de servir de centro metabólico y de formación de organelos dentro del oocito. Durante la previtelogénesis, las células del epitelio folicular se diferencian para formar dos capas. La capa interna formada por células cúbicas

es la granulosa y la externa formada de células alongadas y planas es la teca, ambas capas se encuentran separadas por una membrana base; además una membrana gruesa se forma entre el oocito y la capa granulosa, y se denomina membrana vitelina o zona pelúcida que se caracteriza por tener una apariencia estriada, debido a que se encuentra atravesada por microvellosidades procedentes del oocito y de las células foliculares, que actúan en el transporte de nutrientes hacia el oocito por falta de irrigación sanguínea (Nagahama, 1983; Zohar, 1989).

La siguiente fase es la vitelogénesis que comprende la incorporación de vitelo a su citoplasma, material formado por: proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos que sirven como fuente de energía durante el desarrollo embrionario (Hopson y Wessells, 1990). El vitelo se deposita bajo la forma de: gotas de aceite, vesículas y gránulos de vitelo (Harvey y Hoar, 1979; Piper *et al.*, 1992). Esta fase se divide en vitelogénesis endógena y exógena; durante la vitelogénesis endógena se producen dentro del oocito, las gotas de aceite y la vesículas de vitelo, interviniendo en el proceso el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi; mientras que en la vitelogénesis exógena los gránulos de vitelo se producen a partir de la vitelogenina, fosfolipoproteína producida y secretada por el hígado (Nagahama, 1983; Ng e Idler, 1983; Zohar, 1989).

El proceso hormonal que ocurre durante la vitelogénesis es el siguiente: la capa folicular bajo la influencia de la GtH II produce estradiol-17 β , que liberado al sistema circulatorio y al llegar al hígado estimula la síntesis y secreción de vitelogenina al torrente sanguíneo por donde es transportado hacia el ovario, atraviesa el folículo ovárico y se adhiere a receptores específicos ubicados en la superficie del oocito siendo incorporado al citoplasma mediante micropinocitosis. Una vez dentro del oocito la vitelogenina sufre proteólisis dando origen a las proteínas lipovitelina y fosvitina, componentes de los gránulos de vitelo (Nagahama, 1983; Nagahama *et al.*, 1995; Zohar, 1989). (Ver figura 2)

La producción de estradiol-17 β por parte del folículo involucra la intervención de ambas capas celulares en el proceso. La capa tecal bajo la influencia de la GtH II produce el andrógeno testosterona a partir del colesterol, que es liberado y se adhiere a la capa granulosa donde es aromatizado a estradiol-17 β (Nagahama, 1987; Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995; Zohar, 1989).

Los oocitos post-vitelogénicos son fisiológicamente inmaduros por lo que no pueden ser fertilizados. Para que esto ocurra es necesario que se produzca la maduración final de los

oocitos después de la vitelogénesis. Esto implica la migración de la vesícula germinal (núcleo) del centro hacia el polo animal y la ruptura de su membrana externa reanudándose la división meiótica que se detuvo en la primera fase de la ovogénesis.

Durante ésta fase la primera división meiótica es finalizada y se forma el primer cuerpo polar que es expulsado del oocito. Al mismo tiempo se produce la fusión de los gránulos de vitelo y de las gotas lipídicas y el incremento en el tamaño del oocito debido a su hidratación (Nagahama *et al.*, 1995; Redding y Patiño, 1993; Takashima e Hibiya, 1995; Zohar, 1989). Los mediadores hormonales que intervienen durante la maduración son: la GtH II, esteroides inductores de la maduración (MIS) y el factor promotor de la maduración (MPF) que actúan a nivel de la envoltura folicular, la membrana vitelina y el citoplasma de los oocitos respectivamente (Nagahama, 1994).

Previo a la maduración, las células foliculares adquieren la habilidad de producir MIS en respuesta a la GtH II (Nagahama, 1987). El principal MIS es el $17\alpha, 20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, ($17\alpha, 20\beta$ DP) aunque se ha encontrado que el MIS del *Micropogonias undulatus* es el $17\alpha, 20\beta, 21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona (Bromage y Roberts, 1995; Goetz, 1983; Nagahama *et al.*, 1995; Patiño, 1995; Thomas, 1994; Zohar, 1989). Para la formación del MIS intervienen ambas capas foliculares, la capa tecal produce a partir del colesterol el esteroide 17α -hidroxiprogesterona que atraviesa la lámina basal y se adhiere a la capa granulosa donde es convertido en $17\alpha, 20\beta$ DP (Zohar, 1989). La capacidad de la capa tecal de producir testosterona permanece, mientras que la actividad de aromatización por parte de la capa granulosa decrece lo que provoca que el folículo ovárico disminuya su capacidad de producir estradiol- 17β , obteniéndose elevados niveles de testosterona en el plasma que pueden estar involucrados, a través de retroalimentación positiva en la regulación de la producción y liberación de gonadotropina pre-ovulatoria (Nagahama, 1994; Zohar, 1989). Durante la maduración, los oocitos intra-foliculares desarrollan la habilidad de sufrir GVBD en respuesta a la estimulación hormonal, proceso denominado competencia maduracional que consiste en el incremento de la sensibilidad del oocito hacia ciertas hormonas y ocurre bajo el control de la GtH II (Nagahama, 1994; Patiño y Thomas, 1990; Redding y Patiño, 1993; Thomas, 1994). La competencia maduracional está asociada con el incremento de receptores de MIS en el oocito y el aumento de canales de unión del oocito con las células granulosas (Patiño, 1995). Un evento clave durante la maduración del oocito es la activación del MPF. El MPF está formado por dos subunidades protéicas, una proteína con actividad kinasa y una proteína reguladora conocida como ciclina B (Redding y Patiño, 1993). La proteína kinasa cdc2 se

encuentra presente en el citoplasma y para que la síntesis y activación del MPF se realice es necesario:

- 1) la síntesis de la ciclina B, proceso inducido por el MIS
- 2) la formación del complejo kinasa cdc2-ciclina B, y
- 3) la fosforilación de la treonina de la kinasa cdc2 y de la serina de la ciclina B (Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995). La función del MPF posiblemente es la de servir como un iniciador de la metafase en los oocitos (Nagahama *et al.*, 1995).

Una vez concluida la maduración, se produce el fenómeno de ovulación, consistiendo en la expulsión del oocito maduro de su envoltura folicular. Durante éste proceso existe separación del oocito de la capa granulosa debido al fraccionamiento de las microvellosidades existentes entre ellos, formación de una abertura en la capa folicular provocada posiblemente por la acción de enzimas proteolíticas y contracción de células foliculares específicas provocando la expulsión del oocito a través de la abertura de la capa folicular (Goetz, 1983) hacia la cavidad ovárica, donde inicia la segunda división meiótica hasta llegar a la segunda metafase en donde se detiene la división (Nagahama, 1983; Zohar, 1989).

En la mayoría de los teleósteos, la ruptura folicular y separación del oocito es inducida por la GtH II que posiblemente actúa estimulando la producción de MIS, siguiendo el mismo mecanismo que para la maduración pero con la diferencia que el sitio de acción de estas hormonas puede ser extrafolicular (Redding y Patiño 1993). Otra hormona que actúa en la ovulación es la prostaglandina (PG), principalmente la PG F_{2α}, secretada por el folículo ovárico, estimulando el proceso de contracción folicular (Donaldson y Hunter, 1983; Goetz, 1983; Zohar 1989).

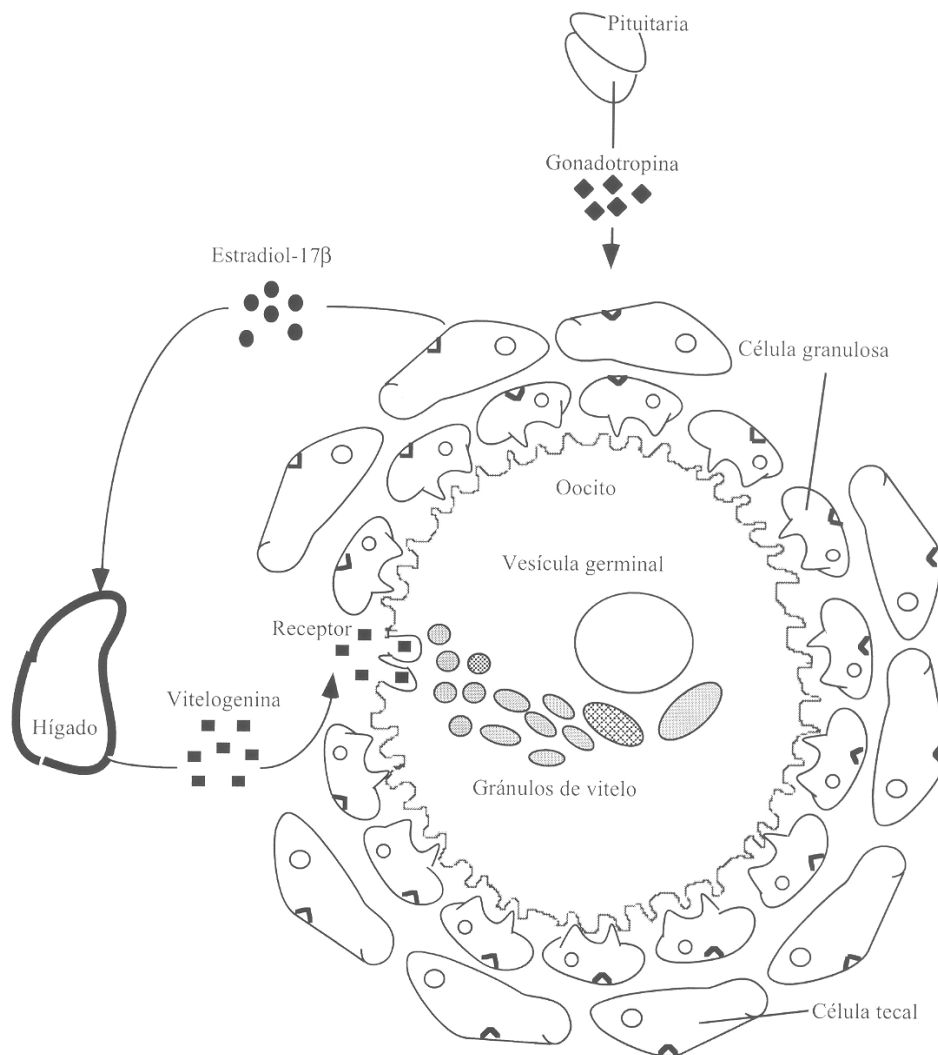


Figura 2. Regulación hormonal de la maduración de los oocitos en los teleósteos.

2.3 Espermatogénesis

La estructura testicular de la mayoría de los teleósteos es de tipo tubular y está conformada inicialmente por 3 tipos de células: las de Leydig ubicadas en la periferia, las de Sertoli ubicadas dentro de los túbulos y que separan a las espermatogonias en varios grupos. El proceso de desarrollo de la espermatogonia para dar lugar a la formación de espermatozoides se denomina espermatogénesis, éste proceso se encuentra dividido en tres fases: meiosis, espermiogénesis y espermiación (Takashima e Hibiya, 1995).

La espermatogénesis inicia con la división mitótica de las espermatogonias primarias, dando lugar a las espermatogonias secundarias que mediante una nueva división mitótica dan origen a los espermatoцитos primarios. Posteriormente los espermatoцитos primarios sufren la primera división meiótica (Meiosis I) o división de reducción, originándose los espermatoцитos secundarios que mediante la segunda división meiótica (Meiosis II) o de equitatividad dan origen a las espermátidas (Nagahama, 1983; Redding y Patiño, 1993, Takashima e Hibiya, 1995; Zohar, 1989).

Las espermátidas mediante el proceso de diferenciación denominado espermiogénesis, dan lugar a los espermatozoides. La transformación involucra la elongación del núcleo, desarrollo de un flagelo y expulsión de citoplasma a través de la parte terminal del flagelo (Redding y Patiño, 1993). El producto final está conformado por una cabeza, un cuello y un flagelo. La cabeza es generalmente de forma esférica u oval y se diferencia del resto de vertebrados por la ausencia del acrosoma, la misma que está involucrada en el proceso de fertilización. El cuello consiste en una porción del flagelo central rodeado de un corpúsculo formado por la fusión de varias mitocondrias (Nagahama, 1983; Takashima e Hibiya, 1995).

La actividad esteroideogénica de las gónadas masculinas se encuentra regulada principalmente por la GtH II (Ver Figura 3). Las células esteroideogénicas que intervienen en la producción de andrógenos son las de Leydig y las de Sertoli (Fostier *et al.*, 1983). Durante las primeras fases de la espermatogénesis, la gonadotropina estimula a las células de Leydig a producir 11- ketosterona, hormona que activa a las células de Sertoli a producir activina B y que a su vez actúa sobre las espermatogonias regulando el proceso de espermatogénesis y espermiogénesis (Fostier *et al.*, 1983; Matty, 1985; Nagahama, 1994). Una vez que la espermiogénesis es completada, toma lugar la espermiación consistente en la expulsión de espermatozoides hacia los vasos deferentes del tracto genital donde son almacenados y adquieren motilidad (Nagahama, 1983; Takashima e Hibiya, 1995; Zohar, 1989). La espermiación se encuentra influenciada por la hormona $17\beta\alpha, 20\beta$ DP, producida por el espermatozoide a partir del esteroide precursor 17β a -hidroxiprogesterona sintetizado por las células somáticas en respuesta a la gonadotropina. La función del $17\beta\alpha, 20\beta$ DP es el de incrementar el pH del conducto espermático, lo que influye de manera positiva en la síntesis de AMP cíclico que interviene en la adquisición de motilidad por parte de los espermatozoides (Nagahama, 1994).

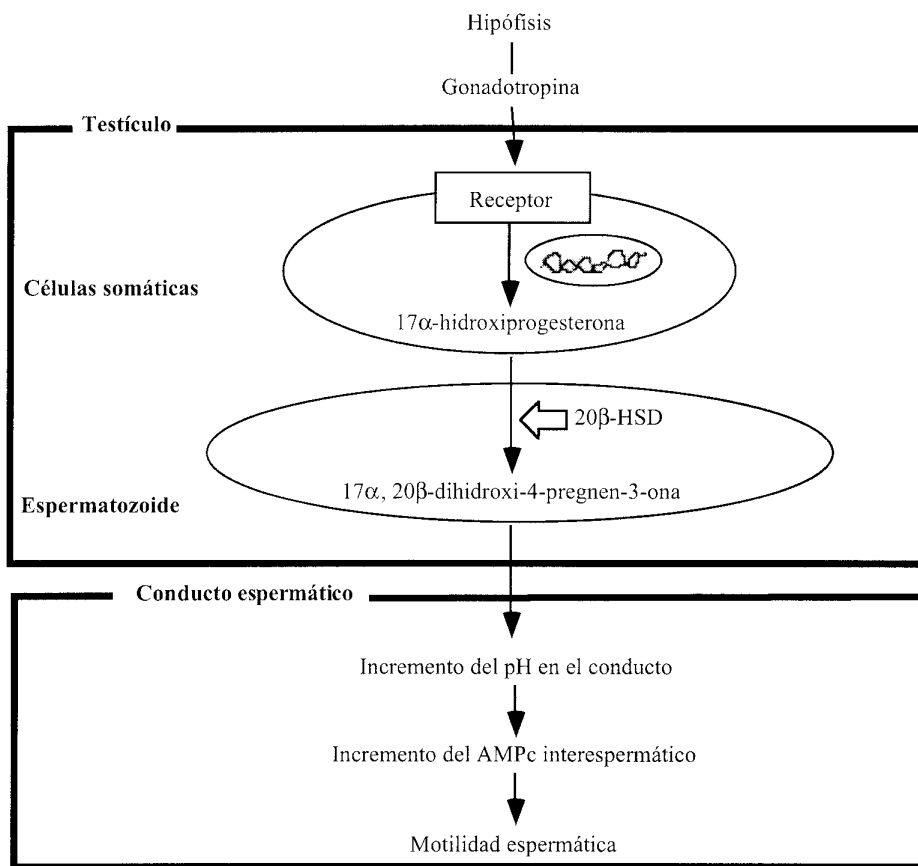


Figura 3. Regulación hormonal de la espermatogénesis en el testículo de teleosteos

3.- PARÁMETROS DE IMPORTANCIA POBLACIONAL RELACIONADOS CON EL SEXO

3.1 Proporción de sexos

La determinación sexual de éste parámetro es útil porque sirve de base para interpretar la composición de los stock explotados y las variaciones en su abundancia y otras características de grupo. Por lo general la proporción sexual se estima como el número de machos / número de hembras y se expresa en porcentajes.

3.2 Escala de madurez sexual

La determinación de las fases de madurez de las gónadas de los peces es una actividad de rutina que sirve para describir los ciclos reproductivos. Si los peces tienen una sola estación de desove anual, se puede establecer un número determinado de fases cuyas diferencias sean distinguibles a simple vista.

3.3 Índice gonadosomático (IGS)

Es un parámetro muy útil para determinar las fases de madurez sexual, representa la relación en porcentaje del peso de las gónadas y el peso del cuerpo. Puede determinarse en relación al peso corporal total ó eviscerado, en éste caso se minimiza el error debido a que se eliminan las influencias de las variaciones del peso del contenido estomacal en el peso corporal. Las formulas que se utilizan son:

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso de las gónadas (g)} \times 100}{\text{Peso Corporal total}}$$

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso de las gónadas (g)} \times 100}{\text{Peso corporal eviscerado}}$$

3.4 Fecundidad

La fecundidad se puede definir como el número de óvulos maduros producidos por una hembra antes del desove o bien como el número de óvulos producidos en un año por una hembra. La fecundidad parece depender de la talla y la edad de los peces; los peces de mayor longitud en una misma especie, producen mayor número de óvulos que los peces de menor talla.

En la mayoría de los casos, la fecundidad se puede relacionar con la longitud del cuerpo mediante la ecuación:

$$F = a L^b$$

Donde: F = Fecundidad L = Longitud de la madre a y b = Coeficientes

El coeficiente a puede servir como una medida directa para comparar la fecundidad entre razas. Las diferencias raciales en el exponente de L no son estadísticamente significativas, siempre hay una gran variabilidad de la fecundidad entre los peces de la misma población, tamaño y edad.

4.- IDENTIFICACIÓN DE MACHOS Y HEMBRAS EN SALMÓN

Los salmones son los "reproductores totales" es decir después de comenzar a madurar las gónadas, todos los huevos o el esperma que van a ser emitidos por cada pez en un solo período de reproducción se desarrollan sincrónicamente. Su emisión ocurre en el breve espacio de una semana más o menos, y su época de reproducción está claramente definida.

El desarrollo de las gónadas va acompañado de la presencia de caracteres sexuales secundarios. En el salmón destaca la transformación de las mandíbulas de los machos. En general, la hembra es más grande que el macho, debido a que se encarga de la prole y es la que aporta los óvulos al momento de la fecundación.

Por lo general, la determinación del sexo en esta etapa no representa dificultad ya que se puede determinar el sexo por las características externas. En cambio, en etapas juveniles es necesario abrir la cavidad visceral y exponer las gónadas para determinar el sexo. Incluso así, la diferenciación entre machos y hembras en fases tempranas de la madurez sexual puede ser difícil y es necesario emplear de equipos ópticos para identificar las gónadas.

La identificación no destructiva del sexo en los salmones adultos cuando no hay evidencias claras de caracteres sexuales secundarios se puede realizar de dos modos:

Utilizando un marcador genético sexo-específico que actualmente no hay ninguno aunque la determinación del sexo en esta especie es genética.

Utilizando alteraciones fenotípicas asociadas con el desarrollo reproductivo.

Los cambios específicos de sexo relacionados con el sistema endocrino de los peces asociados con el desarrollo reproductivo son detectables hasta 12 meses antes del desove. La elevación más pronunciada es en proteína precursora de la vitelogenina del saco vitelino de los huevos en las hembras.

4.1 Vitelogenina

La vitelogenina, según Stifani et al (1990), es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos (anfibios, aves, peces y reptiles), durante el ciclo de maduración ovárica. Esta proteína es un complejo fosfoglicoproteico plasmático, cuyo peso molecular oscila entre 250 y 600 kDa (Norberg y Haux, 1985). Su composición bioquímica es del tipo aminoacídica con lípidos, carbohidratos y fosfatos. Además tiene la capacidad de unir cationes divalentes, principalmente calcio. La presencia de vitelogenina en el plasma es coincidente con la aparición de los primeros gránulos de vitelo en los ovocitos. Su síntesis se lleva a cabo en el hígado inducida por la estimulación de los estrógenos ováricos, de los cuales el más importante es el estradiol (Zanuy y Carrillo, 1987). Una vez secretada por el hígado es transportada vía torrente sanguíneo, de donde es captada en forma selectiva por los ovocitos, los cuales la disocian en dos proteínas fosforadas (lipovitelina y fosvitina), las que actúan como fuente nutritiva para el desarrollo del embrión (Redshaw y Follet, 1971; Carnevali y Belvedere, 1991). Por lo tanto, la síntesis de vitelogenina está estrechamente ligada con el desarrollo gonadal de las hembras.

La vitelogenina, se puede utilizar como un marcador específico para hembras de vertebrados ovíparos que no presentan dimorfismo sexual en las primeras etapas de su desarrollo. Hay diferentes métodos: la inmunoaglutinación (LeBail y Breton, 1981); el radioinmunoensayo (Idler et al., 1979; Hara y col., 1983); la detección en doble difusión (Gordon y col., 1984), la inmunoelectroforesis empleada por Maitre y col., 1985, y el método inmunocolorimétrico que detecta cuantitativamente la vitelogenina sérica, usando el ensayo inmunoenzimático ELISA. Este método se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima específica, de forma que los conjugados que resultan tengan tanto actividad inmunológica como enzimática.

4.2 Método inmunoenzimático mediante ELISA

Procesado de la sangre:

Las muestras se dejan a temperatura ambiente, para que se forme el coágulo y se separe el suero del plasma sanguíneo, se centrifuga a 2.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante

obtenido, el cual corresponde al suero, se transfiere a tubos Eppendorf que se almacenan a -20°C para su posterior análisis.

Anticuerpo empleado para el Inmunoensayo

El anticuerpo anti-vitelo de salmón utilizado, correspondió a suero del conejo, inmunizado con vitelogenina de salmón

Test de Inmuno Ensayo en placa de policarbonato (ELISA)

REACTIVOS, SOLUCIONES, ETC.

-leche 1% (leche en polvo en PBS) o PBS-BSA 1%(Albúmina en PBS 1X)

-PBS 1X

-PBS-Tween (PBS 1X y Tween20 al 0.005%)

-Solución de revelado: 5ml de Buffer citrato* + 250µl de ABTS (20X)**+ 2 gotas de H₂O₂ (agua oxigenada 10%)

-Placa de Elisa Falcon

TAPIZADO

1) 50µl por pocillo de solución problema diluida en PBS (0,5µl suero sanguíneo + 49,5µl PBS 1X)

2) Incubar a 4°C toda la noche

BLOQUEO

3) Añadir a cada pocillo 150µl de leche 1% con azida al 0.01% [15ml por placa]

4) Incubar a 4°C toda la noche o 2 horas a 37°C

ANTICUERPO ANTI-BSA

5) Lavar la placa tres veces con PBS-TWEEN y una vez con PBS

6) Añadir el anticuerpo antivitelogenina diluido 1:1200 V final = 50µl por pocillo [PBS para las diluciones]

7) Incubar 2 horas a 4°C

8) Lavar la placa dos veces con PBS-TWEEN y una vez con PBS

9) 50µl por pocillo de Anti-rabbit IgG***, dilución 1/2000

10) Incubar de 1h30min a 2h a 37°C

11) Lavar la placa dos veces con PBS-TWEEN y una vez con PBS

12) Preparar la solución Avidina(A)-Biotina(B)***a dilución 1:2000(1µLA+ 1µl B en 2000µl PBS 1X). Echar 50µl de la dilución por pocillo e incubar 15min a Tª ambiente.

IMPORTANTE: la dilución debe prepararse 30min antes de ser utilizada y permanecer en oscuridad.

13) Lavar la placa dos veces con PBS-TWEEN y una vez con PBS.

REVELADO Y LECTURA

15) 50µl de solución de revelado por pocillo

16) A los 2-3 minutos bloquear reacción con ácido cítrico 0.1M (50µl/pocillo)

17) Leer a 405nm en el espectofotómetro

RESULTADOS

18) Las hembras de salmón darán a simple vista un color verde intenso mientras que en los machos no detectaremos color o éste será muy débil.

* Mezclar v/v ácido cítrico y citrato sódico ajustar el pH a 4.3 (añadiendo ácido cítrico)

** Una pastilla de ABTS (Sigma-Aldrich, A-9941) en 910 µl de Buffer citrato (eppendorf envuelto en papel aluminio)

***Anti-rabbit, avidina y biotina ,kit comercial VECTASTAIN ELITE ABC KIT de VECTOR LABORATORIES.

5.- MUESTRAS ANALIZADAS

Se analizaron 92 muestras de sangre de salmones retornados a los ríos Ulla y Lézé durante la temporada de pesca del 2007. 17 de las muestras corresponden al río Lézé, tres al río Tambre y 72 al río Ulla. En La tabla 1 se indican los individuos analizados clasificados por río, código, lugar de captura y sexo. M corresponde a macho, H corresponde a hembra y ¿ aparece en los casos en los que la metodología empleada no permite clasificar los individuos como machos o hembras. Lo mas probable, en estos casos dudosos, es que sean hembras es estadios tempranos de desarrollo sexual. Como control al experimento se utilizaron salmones capturados durante la temporada de pesca y que fueron enviados a la piscifactoría donde terminaron su maduración sexual , ver tabla 2.

En la tabla 3 se presenta un resumen del número de machos y hembras por río.

Tabla 1. Resultados del sexado por río código y fecha de captura.

ULLA 2007		
Nº MUESTRA	FECHA CAP.	SEXO ELISA
14599	04-05-07	M
19354	01-05-07	H
19353	01-05-07	M
19360	04-05-07	M
19331	02-05-07	M
19352	01-05-07	M
19351	01-05-07	H
19359	09-05-07	M
14598	11-05-07	H
19332	11-05-07	M
19355	12-05-07	M
19340		H
19356	13-05-07	M
19357	13-05-07	M
19358	15-05-07	H
19333	17-05-07	H
19383	20-05-07	H
19338	19-05-07	H
19339		H
19335	20-05-07	H
19382	20-05-07	M
19381	20-05-07	H
15524	20-05-07	H
19334	18-05-07	M
19362	27-05-07	H
19371	29-05-07	H
19372	29/5/06?	M
19373	29-05-07	H
19336	29-05-06	M
19361	27-05-07	H
19363	30-05-07	M
19364	09-06-07	M
15525	25-05-07	H
19337	03-06-07	H
19366	12-06-07	H
19368	12-06-07	H
10411	05-06-07	H
19367	02-06-07	H
X72	23-05-07	H
X69	23-05-07	?
X104	29-05-07	M
X107	29-05-07	H
X73	23-05-07	H
X70	23-05-07	M

X105	29-05-07	H
X106	29-05-07	H
X74	23-05-07	M
X62	23-05-07	M
X66	22-05-07	M
X71	23-05-07	H
X82	24-05-07	M
X76	24-05-07	M
X68	23-05-07	H
X83	24-05-07	H
X84	24-05-07	H
X78	24-05-07	H
X85	25-05-07	H
X80	24-05-07	H
X77	24-05-07	H
X81	24-05-07	M
X75	24-05-07	M
X111	30-05-07	M
X109	30-05-07	H
X108	30-05-07	M
X112	30-05-07	H
X113	30-05-07	M
X110	30-05-07	H
X158	13-06-07	¿?
X159	13-06-07	H
X160	13-06-07	H
X162	13-06-07	H
X163	13-06-07	H

LÉREZ 2007

Nº MUESTRA	FECHA CAP.	SEXO ELISA
112861	20-07-07	M
12541	13-05-07	M
12542	17-05-07	H
12547		H
12548	22-06-07	H
12549	22-06-07	H
12551	23-06-07	H
12552	30-06-07	H
12553	15-07-07	H
12558	20-07-07	H
12559	26-06-07	H
12560	26-06-07	M
S3	13-05-07	H
S4	13-05-07	H
S6	29-05-07	M
S10	13-06-07	H
S12	27-06-07	M

	TAMBRE 2007	
Nº MUESTRA	FECHA CAP.	SEXO ELISA
TAMBRE 1	12-06-07	M
TAMBRE 2	12-06-07	M
TAMBRE 3	12-06-07	M

Tabla 2. Controles utilizados en el experimento.

	Nº MUESTRAS	RIO	FECHA	SEXO
1	X104	ULLA	29-05-07	M
2	X106	ULLA	29-05-07	H
3	X107	ULLA	29-05-07	H
4	X108	ULLA	30-05-07	M
5	X110	ULLA	30-05-07	H
6	X112	ULLA	30-05-07	H
7	X113	ULLA	30-05-07	M
8	X68	ULLA	23-05-07	H
9	X70	ULLA	23-05-07	M
10	X71	ULLA	23-05-07	H
11	X73	ULLA	23-05-07	H
12	X74	ULLA	23-05-07	M
13	X77	ULLA	24-05-07	H
14	X8	ULLA	24-05-07	H
15	X83	ULLA	24-05-07	H
16	X84	ULLA	24-05-07	H
17	X85	ULLA	25-05-07	H

Tabla 3. Tabla resumen del número de machos y hembras por río

Río	hembra	macho	¿
Ulla	42	28	2
Lérez	12	5	0
Tambre	0	3	0

6.- RESULTADOS EN OTRAS POBLACIONES

Entre los años 1993 y 2003 se realizó un estudio en el que se sexaron, por métodos inmunológicos, el 53% de los salmones capturados durante la temporada de pesca en los ríos Esva, Narca, Sella y Cares. (Pérez y col 2005). Se analizaron un total de 9544 salmones en análisis de las escamas revela que el 67% de los salmones de retorno eran MSW. Los resultados del sexado señalan que, en conjunto, el 71.7% de los salmones capturados eran hembras y que de ellas el 80.7% eran MSW, las capturas no están distribuidas uniformemente a lo largo de la temporada sino que mayor parte de los salmones que se pescan durante los primeros meses de la temporada (de marzo a mayo) son hembras grandes. Por el contrario en julio el 60% de las capturas corresponde a machos que en gran proporción son añales. La proporción de sexos durante la temporada de pesca difiere de la existen en el río durante la época de reproducción ya que las hembras representan el 52,1 % como media de los 11 años analizados.

7.- CONCLUSIONES

Se observa un mayor porcentaje de hembras que de machos con excepción del Tambre en el que los tres salmones analizados son machos. El porcentaje total de hembras excluyendo los dos individuos en los que no ha sido posible determinar el sexo es del 60% que es inferior al 70% detectado en poblaciones de salmón en ríos de Asturias. Esta diferencia puede ser debida al retraso del inicio de la temporada de pesca en los ríos Ulla y Lézé en relación a los ríos que desembocan en el Cantrábrico.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- Bromage N.R., Roberts R.J. 1995. Red drum and other sciaenids. En: BROMAGE, N.R. & ROBERTS, R.J.(eds.) Broodstock management and egg and larval quality, Cap. 6.
- Carnevali O., Belvedere P. 1991. Comparative studies of fish, amphibian, and reptilian vitellogenin. *Journal of Experimental Zoology*, 259: 18-25.
- Idler D.R., Hwang S.J., Crim L.W. 1979. Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *Journal Fisheries Research Board Canada*, 36: 574-578.
- Donalson E.M., Hunter G.A. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. Fish Physiology, Vol. IX (B), Cap. 7.
- Fostier A., Jalaber T.B., Billard R., Breton R., Zohar Y. 1983. The gonadal steroids. En: HOAR, R.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. Fish physiology, Vol.IXA, Cap 7.
- Goetz F.W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. En: Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M. Fish physiology, Vol IXB, Cap. 3.
- Gordon M., Owen T., Ternan T., Hildebran L. 1984. Measurement of a sex specific protein in skin mucus of premature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 43: 333-339.
- Hara A., Tacaño K., Hirai H. 1983. Immunochemical identification of female specific serum protein, vitellogenin, in the medaks, (*Oryzias latipes*). *Comarative .Biochemical Physioogy*. 76A: 135-141.
- Harvey B.J., Hoar W.S. 1979. Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. 48p.
- Hopson J., Wessells S.N. 1990. Animal development. En: HOPSON, J. & WESSELLS, N. Essentials of biology, Cap. XVI.
- Idler D.R., Ng T.B. 1983. Teleost gonadotropins: isolation, biochemistry, and function. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. Fish physiology, Vol. IX A., Cap. 5.
- Idler D. R., Hwang S.J., Crim L.W. 1979. Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *Journal Fisheries Research Board Canada*, 36: 574-578.
- Lagler K.F., Bardach J.E., Miller R.R., May D.R. 1977. Ictiología. Mexico, AGT Editor S.A., 489 p.
- Le Bail P.Y., Breton B., 1981. Rapid determination of the sex of puberal salmon fish by a technique of inmunoagglutination. *Aquaculture*, 22: 367-375.

- Maitre J.L., Le Guellec C., Derrien S., Tenniswood M., Valotaire Y. 1985. Measurements of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis: application to the kinetic analysis of estrogens stimulation in the male. *Canadian Journal of Biochemical. Cellular Biology*, 63: 982-987
- Matty A.J. 1985. *Fish Endocrinology*, 267 p.
- Nagahama Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. *Fish Physiology*. Volume IX Part A, Cap. 6.
- Nagahama Y. 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science*, 4, 209-222.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis. *Fisheries International Journal of Development Biology*, 38: 217-229.
- Nagahama Y., Yoshikuni M., Yamashita M., Tokumoto T. Katsu Y. 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current topics in Developmental Biology*, 30: 103-145.
- Norberg B., Haux C., 1985. Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two salmon species: Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemical Physiology*, 81B:869-876
- Patiño R. 1995. Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous Chemical. Texas Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, Texas. 30 p.
- Pérez J., Izquierdo J.I., de la Hoz J., García-Vázquez E. 2005. Female biased harvest on Atlantic salmon in Spain. *Fisheries Research* 74, 127-133.
- Piper R., McElwain I., Orme L., McCraren J., Fowler L.G., Leonard J.R. 1992. *Fish hatchery management*. U.S. Fish and Wildlife Service, USA,
- Redding J.M., Patiño R. 1993. Reproductive physiology. En: EVANS, D.E. *The physiology of fishes*, Cap. 16.
- Redshaw M.R., Follett B.K. 1971. The crystalline yolk platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian. *Biochemical Journal*, 124: 759-766.
- Shepherd C.J., Bromage N.R. 1988. *Intensive fish farming*. 404 p.
- Stifani S., Le Menn F., Rodríguez J.M., Schneider W.J., 1990. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochemical Biophysics. Acta*, 1045: 271-279.
- Takashima F., Hibiya T. 1995. *Atlas of Fish Histology*, segunda edición. p. 134-153.
- Thomas P. 1994. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. *Perspectives in comparative endocrinology*, p. 619-625.
- Zohar Y. 1989. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. En : SHILO, M. & Sarig, S. *Fish Culture in Warm Water Systems: Problem and Trends*. Florida, p. 65-119

Zanuy M., Carrillo P., 1987. Reproducción de los teleósteos y su aplicación en la acuicultura 1: 1-102. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid

Zohar Y., Pagelson G., Gothilf Y., Dickhoof W., Swanson W., Duguay S., Gombotz W., Kost J., Langer R. 1990. Controlled release of Gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish. *Proceedings of the International Symposium Control. Rel. Bioact. Mater.*, 17, 908-909.