



## Control reproductivo del catán (*Atractosteus spatula*)

MARTÍN GONZÁLEZ\*, ROBERTO MENDOZA\*, CARLOS AGUILERA\*



El catán (*Atractosteus spatula*) es un pez que pertenece al grupo de los lepisosteidos. Se encuentra distribuido desde los Estados Unidos de Norteamérica hasta México. Habita principalmente en cuerpos de agua dulce, como ríos, presas, lagos y lagunas, preferentemente donde existe abundante vegetación acuática sumergida.<sup>1,2</sup> Los niveles poblacionales de esta especie se han visto disminuidos debido, entre otras cosas, al deterioro de su hábitat, al impacto ocasionado por la pesca comercial y a la falta de normatividad para regular su captura.<sup>1</sup>

Aunado a lo anterior, la extracción por la pesca deportiva ha sido intensa, ya que el tamaño que pueden alcanzar (hasta 2 m) los convierte en un atractivo trofeo.<sup>3</sup> Esto se reflejó en la reducción en los niveles de captura que en 1988 registraron catorce toneladas en Tamaulipas y para 1997 sólo una tonelada.<sup>4</sup> En consecuencia, la disminución de los niveles poblacionales implica no sólo la privación de un recurso tradicional para los pes-

cadores y comerciantes de la región noreste del país, sino también el riesgo de que la especie se extinga.<sup>5</sup> Considerando el valor de esta especie, por ser endémica, por la situación actual de sus poblaciones que tienden a desaparecer y sus posibilidades de explotación comercial, actualmente se realizan investigaciones que generan la información necesaria para su conservación y aprovechamiento.

Una solución radica en el desarrollo de técnicas dirigidas hacia el control de la reproducción en cautiverio, como una medida para incrementar las poblaciones de juveniles y de esta manera recuperar las poblaciones amenazadas.<sup>5</sup> La inducción por medio de la manipulación hormonal es una de ellas y ofrece múltiples ventajas, dentro de las cuales destacan la posibilidad de extender el ciclo reproductivo más allá de la temporada natural de reproducción, lo que repercute invariablemente en una mayor producción de crías y la flexibilidad en la programación de la producción de larvas.<sup>3</sup>

Considerando este contexto, el Grupo de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL ha venido realizando inducciones hormonales con ejemplares adultos del Centro

□ El presente artículo está basado en la investigación "Control reproductivo del catán (*Atractosteus spatula*)", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2008 en la categoría de Ciencias de la Tierra y Agropecuarias, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2008.

\*Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

Acuícola Tancol, de la Asociación de Acuicultores de Tamaulipas, en el Desarrollo Acuícola "El Huasteco", así como con los ejemplares cultivados por el mismo grupo, con miras a inducir y asegurar su madurez sexual. Para que la reproducción sexual y, en particular, la fertilización de los gametos se lleven a cabo de manera exitosa en esta especie, es imperativo mantener una proporción sexual adecuada. Sin embargo, uno de los obstáculos es la ausencia de un dimorfismo sexual definido. Por otra parte, la dificultad para la evaluación de la madurez sexual de las hembras impide la selección de los mejores protocolos hormonales. Una alternativa es la utilización de marcadores bioquímicos para identificar el sexo de los animales y que a la vez permitan conocer el estado de madurez de las hembras. Un ejemplo es la vitelogenina, molécula específica de las hembras, cuya concentración aumenta con la recrudescencia gonadal, por lo que en otras especies se ha utilizado, desde hace varios años, como indicador de la madurez sexual.

Ante esta situación, se estableció, como eje principal en el manejo reproductivo del catán, la purificación de esta molécula para utilizarla en la implementación de un inmunoensayo (ELISA) que pudiera utilizarse como herramienta para el sexado de los animales y para determinar el grado de madurez sexual de las hembras, sin causar daño a los ejemplares.

## Metodología

Se emplearon ejemplares de catán (*Atractosteus spatula*) mantenidos en el Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para obtener muestras de vitelogenina.

Para obtener las muestras de plasma con vitelogenina se indujeron dos catanes machos con  $\beta$ -estradiol (E8875-5G, Sigma). La dosis que se usó fue de 10mg/Kg de peso del ejemplar y se inyectaron vía intraperitoneal, mezclando el esteroide en una emulsión de aceite de hígado de bacalao. Como control, a un tercer ejemplar se le inyectó

la correspondiente cantidad de emulsión sin el  $\beta$ -estradiol. Antes de cada inyección se tomó una muestra de sangre. Las inyecciones se llevaron a cabo de manera sucesiva cada ocho días hasta completar cuatro dosis, ocho días después de la última inyección se sacrificaron los ejemplares para obtener el plasma, de acuerdo al protocolo descrito por Hernández.<sup>6</sup> Con la finalidad de detectar vitelogenina en el *mucus* de los animales inducidos se tomaron muestras para comprobar la presencia de esta molécula.

Para su obtención se realizó un raspado en el cuerpo del animal con una espátula, el *mucus* se colocó en tubos de vidrio a los cuales se les agregó un volumen de PBS 0.1M, Tween 0.05% y 60  $\mu$ l/ml de aprotinina. Los tubos se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron a 5,000 rpm por 30 min a 4°C

## Purificación

La purificación se llevó a cabo mediante una modificación del procedimiento descrito por Cortés (2003). Ésta consistió en tres pasos secuenciales: a) filtración en gel con un cromatógrafo modelo Gradi-Frac (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y una columna (XK/26) de 64 cm de altura con 289 ml de Sephacryl-300 HR (Pharmacia Biotech); b) precipitación de acuerdo a la técnica descrita por Wiley *et al.*,<sup>7</sup> se agregaron al plasma tres volúmenes de agua bidestilada ( $\text{bH}_2\text{O}$ ) estéril, 4.8 volúmenes de EDTA (100mM, pH 8) y 1.92 volúmenes de  $\text{MgCl}_2$  (0.5M); c) electroforesis y electroelusión.

Se realizaron geles preparativos de acrilamida a 6%, en los que se depositó el precipitado. Los geles se corrieron a 30 mA. Al terminar la corrida, una parte del gel se cortó para teñirlo e identificar la banda de interés y el resto se guardó en refrigeración. Una vez identificada la banda, se cortó en el gel no teñido. Para purificar la proteína a partir del gel se llevó a cabo una electroelusión. La banda, previamente reducida en fragmentos, se depositó en una bolsa de diálisis con una jeringa. A la

bolsa de diálisis se le agregaron 2 ml de buffer Tris-glicina con SDS y PMSF 2mM, la bolsa se colocó en una cámara de electroforesis horizontal con el mismo buffer y la electroelución se llevó a cabo a 20 mA por 3 hrs. La proteína se caracterizó por su peso molecular y grupos protéticos (carotenoides).

Para verificar la presencia de la vitelogenina, durante el proceso de obtención y purificación, se prepararon geles de agarosa para identificar la molécula por inmunodifusión utilizando como estándar vitelogenina de *A. tropicus* y anticuerpos dirigidos contra esta molécula. Igualmente, se realizaron geles de poliácridamida para identificar la molécula por su peso molecular, y se llevaron a cabo *Western Blots* para comprobar que la banda cruzara con el anticuerpo. La presencia de la vitelogenina se comprobó por doble inmunodifusión de acuerdo al método de Ouchterlony.<sup>8</sup> Las pruebas se llevaron a cabo en placas de agarosa a 1% elaboradas sobre Gel-Bond (Pharmacia) en un buffer Tris-HCl 10mM, 0.1% de  $\text{NaN}_3$ , pH 7.3.

### Producción y purificación de anticuerpos

Los anticuerpos (anti-VTG) se generaron en un conejo macho de la raza Nueva Zelanda, inyectando la molécula purificada de acuerdo al protocolo descrito por Santillán.<sup>9</sup> Se separaron los IgG del antisuero mediante la utilización de una columna de 10 ml con proteína A Sepharosa CL-4B (Pharmacia), de acuerdo a la metodología descrita por Cortés.<sup>10</sup>

### ELISA

El inmunoensayo que se implementó fue un ELISA competitivo, basado en el descrito por Specker y Anderson,<sup>11</sup> con algunas modificaciones. Se emplearon dos anticuerpos, el anticuerpo primario que se obtuvo con la vitelogenina purificada (anti-VTG) y el secundario fue un anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP-Goat Anti-Rabbit IgG, Zymed Laboratories). La estandarización se

basó en el protocolo general siguiente: se unió el antígeno (VTG) a la placa (Nalgene, Nunc) en 200  $\mu\text{l}$  de buffer, incubándose toda la noche a 4°C. Posteriormente se desechó el contenido de la placa por inversión y se lavaron los pozos con buffer PBS-Tween 1:1,000. Enseguida se bloqueó con 200  $\mu\text{l}$  de PBS que contenía 5% de leche descremada (Svelty, Nestlé) y se incubaron las placas durante 2 hrs a 37°C. Al término de la incubación, la solución se desechó y se lavaron los pozos. Como paso siguiente, la competencia se llevó a cabo agregando 200  $\mu\text{l}$  de buffer de dilución (PBS-Tween20 1:1,000 y 5% de leche descremada) que contenía una mezcla, previamente incubada por 1 hr a 37°C, de una cantidad fija de anticuerpo anti-VTG y diferentes cantidades de VTG, correspondientes a la curva estándar o las muestras. Para este efecto se realizó una incubación por 1 hr a 37°C, se desechó la solución y se lavaron nuevamente los pozos. El anticuerpo secundario se diluyó en 200  $\mu\text{l}$  de PBS-Tween20 1:1,000 y 1% de leche descremada y se incubó por 1 hr. a 37°C, se desechó la solución y se lavaron los pozos. Para revelar la reacción se utilizaron 100  $\mu\text{l}$  del sustrato ortofenilendiamina (0663P-OPD, Research Organics) (10x OPD en buffer de citratos 1M, pH 4.5) y se incubó por 20 min a 37°C en oscuridad. Finalmente, la reacción se detuvo con 50  $\mu\text{l}$  de HCl 1N y se leyó la placa a 492 nm en un lector de microplacas (Tecan, Sunrise Remote Control). Todos los lavados se realizaron agregando 200  $\mu\text{l}$  de buffer de PBS-Tween 1:1,000, desechando el contenido por inversión y secando sobre servilletas de papel. El proceso se repitió cinco veces en cada ocasión. Además del establecimiento de las condiciones óptimas de los reactivos, se llevaron a cabo diversas pruebas de calidad para la validación del ensayo.<sup>11</sup>

### Resultados

El seguimiento de la producción de VTG por inmunodifusión doble reveló la presencia de VTG a partir de la primera semana después de la induc-

ción (figura 1). Asimismo, se constató que no había reconocimiento de la proteína en el control (C). En las muestras de *mucus* sólo hubo reconocimiento hasta el final de la inducción. Cabe remarcar que se apreciaron dobles líneas de precipitación en la mayoría de los pozos. La electroforesis en poliacrilamida reveló la existencia de una banda de entre 150 y 205 KDa, que corresponde a la vitelogenina, pero sólo a partir de la segunda semana después de la inducción (figura 2).

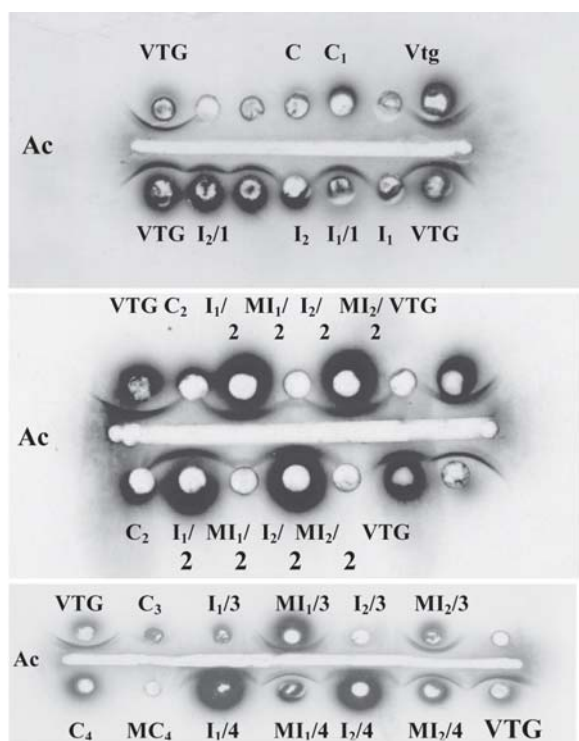


Fig. 1. Inmunodifusión doble en geles de agarosa a 1% con las muestras de plasma y *mucus* obtenidas durante la inducción. VTG, vitelogenina y Ac, anticuerpos anti-VTG, ambos de *A. tropicus*. C: control, I<sub>1</sub> individuo 1, I<sub>2</sub>: individuo 2, M: *mucus*. X/1. primera semana...X/4: cuarta semana.

## Purificación

### Filtración en gel

Se depositaron 0.5 ml de los 20 ml de plasma colectados, al final de la inducción de uno de los ejemplares (I<sub>2</sub>/4). El perfil de elución de las proteínas de dicha muestra (figura 3) reveló un pico

predominante desde la fracción 35 hasta la 43. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante electroforesis en PAGE-SDS y se observaron bandas principales de alto peso molecular asociadas a otras. Después de la calibración de la columna de filtración en gel, se calculó un peso molecular aparente para las fracciones 37 a 41, de 585 KDa, de acuerdo a su coeficiente Kav.

### Precipitación

Debido a que la precipitación, según el protocolo original descrito por Wiley *et al.*,<sup>7</sup> no ofrecía buenos resultados ya que la mayor parte de la VTG se quedaba en el sobrenadante, se realizaron ensayos

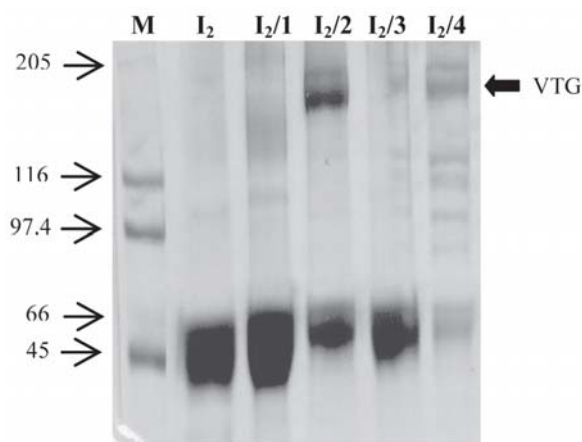


Fig. 2. PAGE-SDS a 6% que muestra las diferentes concentraciones de VTG en el plasma, durante la inducción. M, marcador de peso molecular.

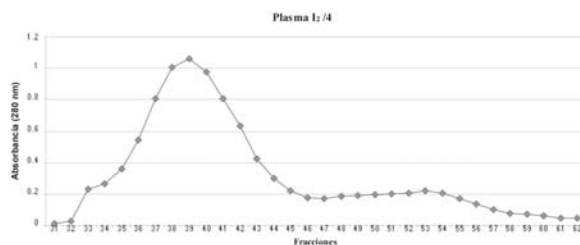


Fig. 3. Perfil de elución de la filtración en gel de las proteínas plasmáticas del macho inducido; se depositaron 0.5 ml de plasma (I<sub>2</sub>/4) en una columna de Sephacryl-300. Se colectaron fracciones de 4 ml y la absorbancia se siguió a 280 nm. Electroforesis de las fracciones de la cromatografía de exclusión. PAGE-SDS a 6% teñido con azul de Coomassie. Pl, plasma I<sub>2</sub>/4; los números corresponden a las fracciones.

modificando la dilución de la muestra. Así, inicialmente se agregaron tres volúmenes de agua bidestilada ( $\text{bH}_2\text{O}$ ) a la muestra antes de la precipitación, quedando la mayor parte de la VTG en el precipitado y al agregar seis volúmenes más se comprobó que la cantidad de VTG que quedaba en el sobrenadante era mínima (figura 4).

Los diferentes pasos de purificación de la proteína obtenida se recapitulan en la figura 5A. La proteína resultante de la precipitación fue reconocida por el anticuerpo de *A. tropicus*, y ésta fue la que se utilizó para la inmunización.

### Electroelusión

Con la electroelusión se obtuvo una banda única de VTG purificada (figura 6A) que fue reconocida más adelante por el anticuerpo anti-VTG en *Western Blot*.

### Obtención de anticuerpos

Se obtuvieron 15 ml de suero, los cuales fueron purificados por cromatografía de afinidad con proteína A para separar las inmunoglobulinas. Mediante *Western Blot* (figura 7) se comprobó que es-

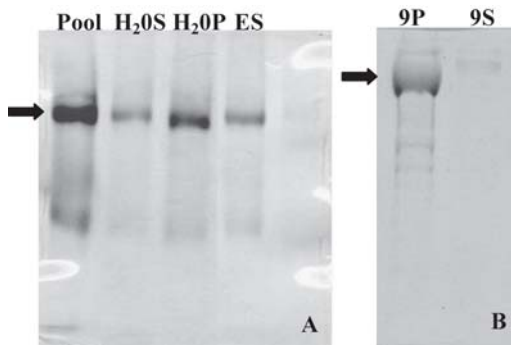


Fig. 4. Comparación de los resultados de la precipitación selectiva de la VTG mediante electroforesis en PAGE-SDS a 6%. A., de acuerdo al método original, únicamente con EDTA y  $\text{Mg}^{2+}$  (ES, sobrenadante y EP, precipitado) y agregando tres volúmenes de  $\text{bH}_2\text{O}$  ( $\text{H}_2\text{OS}$ , sobrenadante y  $\text{H}_2\text{OP}$ , precipitado). B. resultado de la precipitación después de agregar seis volúmenes más de  $\text{bH}_2\text{O}$  al sobrenadante (9P, precipitado, y 9S, sobrenadante). Las flechas señalan la banda de VTG. tinción con azul de Coomassie.

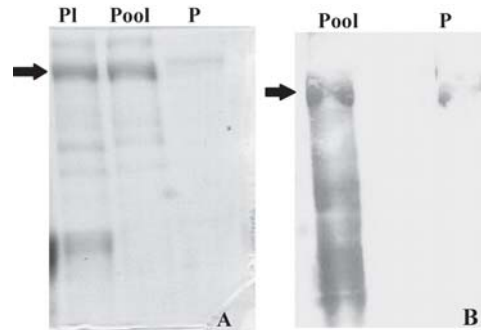


Fig. 5. Análisis de las proteínas durante el proceso de purificación de la VTG. A. PAGE-SDS a 6%. PI, plasma inducido; pool, fracciones de la cromatografía de exclusión; P, precipitado de la VTG. B. *Western Blot* con anticuerpo de *A. tropicus*, pool, fracciones de la cromatografía de exclusión; P, precipitado de la VTG. Las flechas indican la banda de VTG.

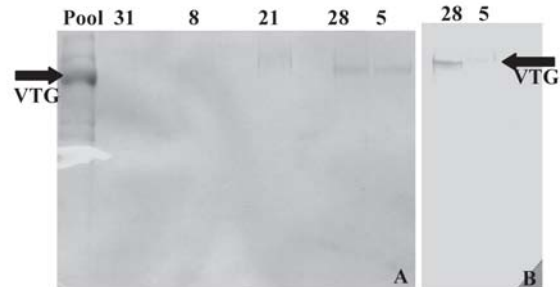


Fig. 6. A. PAGE-SDS a 6%. Pool, fracciones del cromatógrafo. 31, 8, 21, 28, 5, VTG electroeluida en diferentes ocasiones. B. *Western Blot* con dos proteínas electroeluidas.

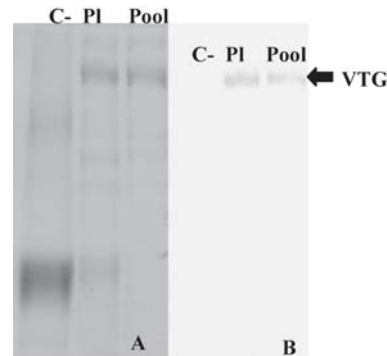


Fig. 7. PAGE-SDS al 6% (A), *Western Blot* (B). C-, plasma de macho; PI, plasma inducido; pool, fracciones del cromatógrafo.

tos anticuerpos antiVTG purificados reconocían la banda correspondiente a la VTG en el plasma, y en el pool, contrariamente, no reconocía banda alguna en el control negativo (plasma de macho).

## ELISA

### Estandarización

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

Tabla I. Absorbancias obtenidas con tres buffers de unión.

Buffer	Promedio del blanco (tres repeticiones)	Promedio de absorbancia-blanco (tres repeticiones)
Acetatos	0.095	1.981
PBS	0.126	1.812
Carbonatos	0.089	1.943

Tabla II. Valores obtenidos en una prueba de estandarización.

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

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

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

Con base en los resultados de las pruebas de competencia, se decidió por las condiciones finales del ELISA (tabla III), con las cuales se obtuvo una buena linealidad (figura 8), para empezar con la validación.

Tabla III. Condiciones finales del ELISA.

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

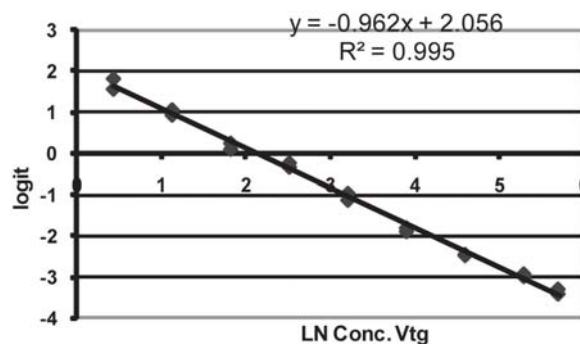


Fig. 8. Regresión de la curva de 300 a 1.5 ng de VTG.

### Validación

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

Tabla IV. Características del ELISA

Rango de linealidad	$R^2$ 0.9942-0.9964 (n = 6)
Límite de detección	1.5 ng (da 87.9% de unión)
Coefficiente de variación interensayo	22% (n = 57)
Coefficiente de variación intraensayo	18% (n = 46)
Recuperación	Con plasma de macho 87% Con plasma inducido 99%

## Análisis de las muestras

Los resultados de la cuantificación de proteínas y de la cantidad de VTG presente en las muestras se resumen en la tabla V. En el análisis de las muestras de plasma con el ELISA se encontró que durante la inducción hubo dos picos de producción de VTG en el plasma (figura 8), el primero se encontró en la segunda semana después de la inducción y el segundo al final. En el caso del *mucus* se observó un aumento constante de la concentración de VTG a lo largo de la inducción.

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

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

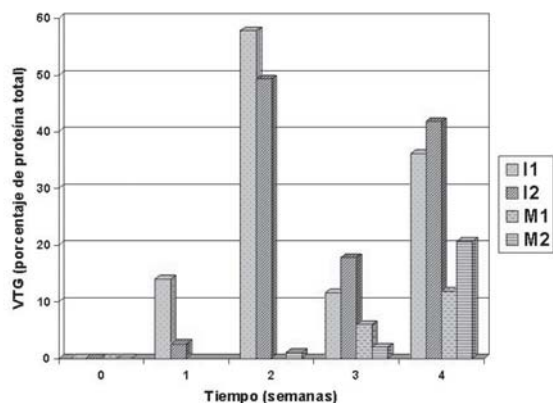


Fig. 9. Concentración de VTG en plasma (I1 e I2) y en *mucus* (M1 y M2) de los ejemplares inducidos.

Los resultados del análisis de varianza, desarrollado para determinar las diferencias existentes entre las muestras de las cuatro semanas de la inducción, revelaron que no había diferencias significativas entre las repeticiones (valores obtenidos en diferentes ensayos para la misma muestra), pero

sí entre las semanas ( $F = 0.7023$ ; g.l. = 10;  $P < 0.05$  y  $F = 0.0001$ ; g.l. = 3;  $P < 0.05$ , respectivamente, para el ejemplar 1 y  $F = 0.8997$ ; g.l. = 13;  $P < 0.05$  y  $F = 0.0003$ ; g.l. = 3;  $P < 0.05$ , respectivamente, para el ejemplar 2).

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

## Discusión

### Obtención de VTG mediante inducción de machos por estradiol

En el presente trabajo obtuvo vitelogenina plasmática por medio de la inducción de machos con  $\beta$ -estradiol, siguiendo el protocolo usado anteriormente por Hernández<sup>6</sup> en *A. tropicus*. La misma dosis (10 mg de  $\beta$ -estradiol/Kg de peso del pez a la semana) fue empleada por Norberg y Haux<sup>12</sup> en *Salmo gairdneri* y en *Salmo trutta*, por Tyler y Sumpter<sup>13</sup> en *Cyprinus carpio* y por Schafhauser-Smith y Benfey<sup>14</sup> en *Salvelinus fontinalis*, aparece después de la inducción por estradiol presenta un tamaño de aproximadamente 180 KDa, determinado por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (figura 6). Varios autores han reportado un peso molecular de entre 150 y 200 KDa para el monómero de la VTG, en diferentes especies de peces.<sup>16,19,21-25</sup> Para *A. tropicus*, Hernández<sup>6</sup> reportó un peso de 177 KDa, valor similar al que obtuvimos para el catán. En este trabajo se encontró que, en condiciones nativas, la VTG del catán presenta un peso molecular aparente de 585 KDa por filtración en gel. Este peso se encuentra en el intervalo de los reportados por otros autores, para diferentes especies de peces, quienes utilizaron este mismo método o el de electroforesis en condiciones nativas (tabla I). Para el catán, Cortés<sup>10</sup> reportó un peso molecular de 315.5 KDa para la

lipovitelina, calculado por filtración en gel; esta proteína es un producto de la VTG, por lo que cabe esperar que su peso sea menor al de ésta.

Varios autores coinciden que en condiciones nativas la proteína se presenta como un dímero, el cual puede estar asociado a otras proteínas plasmáticas.<sup>16,22,26</sup> Aparentemente, la VTG del catán presenta el mismo tipo de comportamiento y el análisis electroforético de las fracciones de la cromatografía de exclusión evidenció también proteínas asociadas a la VTG, de un peso molecular de alrededor de 100 y 120 KDa y dos de un peso similar al de la VTG (figura 8).

Además, en este trabajo se contó con un anticuerpo desarrollado contra la VTG de *A. tropicus*,<sup>6</sup> una especie emparentada con el catán. Por tal motivo, también se confirmó la identificación inmunológica de la proteína producida durante la inducción mediante el método de inmunodifusión doble (figura 5), y de *Western Blot* para identificar la banda y seguir el proceso de purificación de la proteína (figura 10).

Finalmente, la proteína del catán mostró las características esperadas durante su purificación mediante precipitación selectiva como se analizará en el punto siguiente.

### Purificación de la VTG

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

Mediante la filtración en gel de una muestra de plasma, de un ejemplar inducido, se logró separar un pico predominante de alto peso molecular (figura 7). El análisis de estas fracciones, por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (figura 8), reveló que la proteína todavía estaba asociada a dos proteínas de un peso molecular muy similar a la VTG y también se observaron bandas de bajo peso molecular. Este resultado coincide con lo reportado por Tyler y Sumpter,<sup>13</sup> quienes al someter las fracciones de la filtración en gel a un intercambio de iones encontraron que la VTG había eluido con otras proteínas de alto peso molecular. Por su parte, Yao y Crim<sup>15</sup> encontraron también proteínas de un peso molecular similar a la VTG en una electroforesis en condiciones nativas. Por último, Mañanós *et al.*<sup>23</sup> y Schaufhause-Smith y Benfey<sup>14</sup> también reportan falta de resolución con la cromatografía de exclusión y consideraron que es necesario un segundo paso de purificación para obtener la proteína pura, concordando con las etapas adoptadas en este estudio.

La precipitación selectiva de la VTG fue empleada por Wiley *et al.*<sup>7</sup> en *Xenopus laevis*. El método consistió en una doble precipitación, primero con EDTA y Mg, redisolviendo la pastilla obtenida y posteriormente volviendo a precipitar la VTG con H<sub>2</sub>O para eliminar posibles impurezas precipitadas en el primer paso. En el presente trabajo se realizó la precipitación, siguiendo el procedimiento anterior a partir del *pool*, pero sólo redisolviendo la primera pastilla, logrando así eliminar casi totalmente las bandas de bajo peso molecular encontradas en él. Sin embargo, al analizar la pastilla y el sobrenadante resultantes de este procedimiento (figura 9A), se encontró que la cantidad de VTG recuperada en la pastilla era mínima, comparada con la encontrada aún en el sobrenadante. Por lo anterior, se repitió la precipitación después de diluir el *pool* con tres volúmenes de H<sub>2</sub>O. En esta ocasión se obtuvo una mayor cantidad de VTG precipitada, pero aún quedaba VTG en el sobrenadante. Después se realizaron



pruebas agregando seis y nueve volúmenes más de H<sub>2</sub>O al sobrenadante, de acuerdo a los resultados, finalmente se optó por agregar seis volúmenes, logrando así obtener la mayor parte de la VTG en la pastilla después de la centrifugación (figura 9B). Finalmente, se utilizaron estas adaptaciones al método original para precipitar la VTG del *pool*. Diversos autores han manejado adaptaciones al método original de Wiley, por ejemplo Maitre *et al.*<sup>27</sup> agregaron 25% de agua al volumen inicial de plasma para facilitar la precipitación de la VTG de *Salmo gairdneri*.

En otro trabajo, Copeland y Thomas<sup>28</sup> llevaron a cabo la precipitación de la VTG de *Cynoscion nebulosus*, diluyendo 5 ml de plasma en 2 L de agua con 10mM EDTA y dejando precipitar toda la noche. En contraste, Núñez *et al.*,<sup>29</sup> al trabajar con VTG de *Solea vulgaris*, y Norberg y Haux<sup>12</sup> con *Salmo trutta*, llevaron a cabo el procedimiento original de la precipitación sin reportar inconvenientes en sus resultados al respecto.

Con la modificación a la precipitación se obtuvo la banda de VTG libre de las proteínas de bajo peso molecular; sin embargo, una banda de mayor peso molecular que coeluyó con la VTG en la cromatografía de exclusión se encontraba aún en el precipitado, por esta razón se intentó un tercer paso de purificación: electroforesis y electroelución de la banda. Este procedimiento permitió obtener la banda de VTG pura y sin signos de degradación, pero las cantidades obtenidas eran mínimas y la proteína tenía tendencia a precipitar, por lo que no se pudo utilizar en el ELISA. Por esta razón se prefirió utilizar la proteína precipitada para inmunizar al conejo.

La presencia de dos bandas después del proceso de purificación también fue reportada por Hernández,<sup>6</sup> quien, después de purificar con precipitación e intercambio de iones, encontró que la banda de VTG todavía estaba asociada a otra banda de un peso molecular similar. En el caso del catán se presentó un resultado similar al trabajar con la lipovitelina, donde Cortés<sup>10</sup> encontró dos bandas, una de 167.57 KDa y otra de 149.28 KDa,

después de la purificación mediante precipitación, filtración en gel e intercambio de iones.

#### Purificación y especificidad de los anticuerpos

El protocolo de inmunización permitió obtener suero con un buen título de anticuerpos antiVTG, lo que sugiere que la VTG es inmunogénica. Este resultado se puede explicar por su alto peso molecular y por el hecho de no presentar una contraparte homóloga en el conejo. La purificación de los anticuerpos se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con proteína A. Con este procedimiento se lograron aislar las IgG del suero hiperinmune, y se eliminaron otros componentes del mismo. Los anticuerpos anti-VTG eluyeron de la columna con el buffer a pH ácido, ya que de las fracciones obtenidas, sólo éstas reaccionaron con el *pool*. Adicionalmente, dichas fracciones reconocieron la banda de VTG en el plasma y en el *pool* (figura 7B), por lo que éstas se guardaron como anticuerpos antiVTG purificados.

La especificidad de los anticuerpos se demostró al reconocer la banda de VTG en el *pool* y el plasma y no producir reacción con el plasma de macho (figura 7B). Asimismo, mediante una inmunodifusión doble, los anticuerpos antiVTG reconocieron el estándar de VTG de *A. tropicus*, lo que se explica al ser ésta última una especie estrechamente relacionada con el catán. Además, la calidad de los anticuerpos desarrollados se comprobó al obtener una sola banda de precipitación en todas las pruebas de inmunodifusión doble y al no ver señal inespecífica con las proteínas plasmáticas de los machos, lo cual contrasta con los anticuerpos desarrollados para la VTG de *A. tropicus*, los cuales formaban dos bandas de precipitación y eventualmente presentaban reacciones cruzadas con los machos.<sup>6</sup>

#### ELISA

Varios autores han realizado inmunoensayos tipo ELISA para cuantificar la VTG en diferentes espe-

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

La especificidad del ensayo fue demostrada, como lo reportaron otros autores, por la falta de reacción del anticuerpo con el plasma de machos, lo que quiere decir que los anticuerpos no reaccionan con otra proteína que no sea la VTG. También se demostró porqué los anticuerpos reconocen la proteína encontrada en el plasma y en el *mucus*, al igual que a la proteína purificada.<sup>16,22,24,29-31</sup> Esto confirma los resultados obtenidos con las pruebas de *Western Blot*. Además, en el ELISA se demostró que tampoco hubo reacción con proteína alguna de las muestras de una especie (*Chirostoma estor*) no relacionada con el catán. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el anticuerpo que obtuvimos reconoce la proteína en *A. tropicus*, por lo que cabe esperar que este ensayo pueda detectar niveles de VTG en el pejelagarto y posiblemente en otros lepisosteidos.

La sensibilidad del ensayo, concentración de VTG que dio un 87.9% (n = 6) de unión, fue de 1.5 ng/pozo (15 ng/ml). Este valor es igual al que reportaron Cuisset *et al.*,<sup>30</sup> también es similar a otros valores reportados.<sup>14,16,19,22,24,29</sup> Aunque otros autores han reportado una sensibilidad mayor, como Mendoza *et al.*,<sup>31</sup> con una sensibilidad de 2.3 ng/ml, y Mañanós *et al.*<sup>23</sup> con 1 ng/ml. Sin

embargo, algunos de los autores han encontrado que la sensibilidad en sus ensayos es suficiente para medir las concentraciones de VTG de acuerdo a los niveles que encontraron para la especie. Así, Cuisset *et al.*<sup>30</sup> reportaron que los niveles mínimos de VTG encontrados en hembras al inicio de la vitelogénesis fueron de 160 µg/ml en *Acipenser baeri*. Nuñez *et al.*,<sup>29</sup> en un trabajo con *Solea vulgaris*, consideraron suficiente la sensibilidad alcanzada, ya que la concentración mínima de VTG que encontraron para esta especie fue de 100 µg/ml en hembras en el periodo de reposo. Bon *et al.*,<sup>16</sup> en un ensayo para la VTG de *Oncorhynchus mykiss*, encontraron que el nivel de VTG en hembras inmaduras era de 65 µg/ml y en hembras juveniles un año o más antes de su primera ovulación es de 1µg/ml.

Para el catán no hay cantidades reportadas de los niveles de VTG en las hembras. Sin embargo, Hernández<sup>6</sup> reportó para *A. tropicus* una concentración menor de 1.3 mg/ml de VTG en machos, de 1.4 a 2.9 mg/ml para hembras en el proceso de vitelogénesis y mayor de 3 mg/ml para hembras maduras. En nuestro ensayo la sensibilidad alcanzada permitiría detectar un porcentaje de 0.2 10<sup>4</sup> % de VTG en comparación a las proteínas totales. Por lo cual la prueba desarrollada se considera suficientemente sensible.

La variación interensayo (22%) que se obtuvo fue alta comparada con la obtenida por otros autores,<sup>16,22,29-31</sup> sin embargo, es similar a la obtenida por Hennies *et al.*<sup>25</sup> quienes, en un ensayo con *Cyprinus carpio*, alcanzaron 24%, en éste los autores explican que la elevada variación se debió a la degradación de la VTG. En nuestro caso cabría esperar que la variación se deba a la misma causa, ya que se usaron las mismas muestras en los diferentes ensayos, por lo que fueron sometidas a varios ciclos de congelación y descongelación. Además, en base al resultado obtenido del análisis de cuatro curvas estándar, donde se encontró que no había diferencias significativas entre ellas, se puede decir que la reproducibilidad del ensayo es buena. La variabilidad intraensayo fue de 18%,

valor similar al obtenido por algunos autores.<sup>30,22</sup> La recuperación fue de alrededor de 100% cuando se ensayó con plasma de un ejemplar inducido; sin embargo, al mezclar la VTG con el plasma del control, se encontró que la recuperación bajaba a 87%. Lo que se podría explicar por la interacción de la VTG con proteínas plasmáticas que podrían secuestrar a la proteína y evitar que se una los anticuerpos.

## Resumen

El catán (*Atractosteus spatula*) es el pez dulceacuícola de mayor tamaño en las aguas continentales de México. Es muy apreciado tanto por la calidad de su carne como por su tamaño. Como consecuencia, las poblaciones han declinado drásticamente. Desde 1982 se han emprendido esfuerzos para controlar la reproducción en cautiverio y poder obtener una producción satisfactoria de larvas. Dentro de los aspectos que han impedido este objetivo se encuentran: su corta temporada reproductiva, la edad de los reproductores, la imposibilidad de determinar su madurez sexual, pero el principal problema es la imposibilidad para distinguir hembras de machos, lo que evita establecer una proporción adecuada de reproductores para lograr una fertilización óptima. Dentro de este contexto, una parte de esta investigación estuvo dirigida a la determinación de la vitelogenina (VTG), molécula precursora del vitelo y característica de hembras en etapa reproductiva. La vitelogenina plasmática fue aislada y purificada por medio de cromatografía de filtración en gel, precipitación selectiva con y electro-elusión. Las moléculas purificadas fueron caracterizadas por su peso molecular y grupos prostéticos. Se generaron anticuerpos policlonales y se obtuvieron IgGs por medio de cromatografía en proteína "A". Con los antígenos y anticuerpos purificados se llevaron a cabo pruebas de reacción cruzada, lo que permitió el reconocimiento de hembras y machos; logrando con esto el establecimiento de proporciones adecuadas para la reproducción. Se probaron

diferentes protocolos hormonales para la inducción de la maduración y el desove, siendo los factores liberadores de gonadotropinas los que dieron mejores resultados. Se desarrolló un ELISA competitivo, el cual fue sometido a pruebas de control de calidad. El inmunoensayo fue validado determinando concentraciones de VTG en plasma y *mucus* de hembras maduras y evaluando los protocolos hormonales. La cuantificación de VTG por ELISA constituye una alternativa práctica, confiable y rápida para identificar el género de los adultos de catán sin sacrificarlos y puede usarse como un marcador del progreso de la madurez sexual.

**Palabras clave:** Catán, Reproducción, Factores liberadores de gonadotropinas, ELISA, Vitelogenina

## Abstract

Alligator gar (*Atractosteus spatula*) is the largest freshwater fish inhabiting rivers draining into the Gulf of Mexico. These fishes have traditionally been harvested in the northeast region of Mexico, where they are highly appreciated for their size and the quality of their meat. As a consequence, gar populations have drastically declined. Since 1982 several efforts have been made to accomplish their reproduction in captivity to overcome the limited supply of larvae. Several aspects have hindered the successful reproduction of adult alligator gar, such as their short natural reproductive season, the mean age of the breeders, the fact that females cannot determine their sexual maturity, and first and foremost because of the impossibility to distinguish males from females, which prevents the establishment of an adequate sex proportion required for optimal fertilization. Within this context, a part of this research was aimed to the determination of vitellogenin, which is the precursor of yolk and thus specific of females in reproductive stage. Plasmatic vitellogenin (VTG) was isolated and purified by means of three sequen-

tial steps including gel filtration chromatography, selective precipitation, and electroelution. The purified molecules were characterized by their molecular weight and their prosthetic groups. Polyclonal antibodies were raised in rabbits using the purified molecules and IgG's were obtained by Protein «A» chromatography. With both purified antibodies and antigens, cross reaction tests were performed which allowed the straightforward separation of males from females to establish the adequate proportions for reproduction. Different hormonal protocols were used to induce maturation and spawning. Among the hormones used, gonadotropin releasing factors showed the best results. A competitive ELISA was developed and submitted to a set of control quality tests. The immunoassay was validated by measuring VTG concentrations in plasma and mucus of gar females. Furthermore, the ELISA was used to evaluate hormonal protocols. Quantification of VTG by ELISA constitutes a practical, reliable, and quick alternative to identify the gender of alligator gar adults without their sacrifice and can be used as a definitive marker for the onset and progress of maturation in female alligator gar. This research provides a basis for mass production of larvae for repopulation experiments and for the culture of commercial-size alligator gar.

**Keywords:** Alligator gar, Reproduction, Gonadotropin releasing hormone, ELISA, Vitellogenin.

## Referencias

- Morales, G. (1987). Reproducción y desarrollo embriológico del catán (*Lepisosteus spatula* Lacepede): Primeros resultados. SEPES. Dirección General de Acuicultura.
- Suttkus, R. D. (1963). Order Lepisosteii. In: Fishes of the Western North Atlantic. Mem. Sears. Foundation Mar. Res. 1(3): 630 pp.
- Mendoza, R., Aguilera, C., Montemayor, J., Rodríguez, G. y Castro, R. (2000a). Aspectos reproductivos de los lepidosteidos, con énfasis en las perspectivas para el control de la reproducción del catán (*Atractosteus spatula*). En: Primera Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura, INP-SEMANARP. Álvarez Torres, P. (ed.) 103-121.
- Diario Oficial de la Federación (2000). Cultivo y pesquería del catán. 28 de agosto de 2000. Tercera sección. pp. 56 y 57.
- Mendoza, R., Aguilera, C., Montemayor, J., Rodríguez, G. y Márquez, G. (2000b). Biología de los lepidosteidos, y estudios orientados hacia la recuperación de las poblaciones naturales del catán (*Atractosteus spatula*) (Lacepede, 1803). En: Primera Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura, INP-SEMANARP. Álvarez Torres, P. (ed.) 281-291.
- Hernández, U. (2002). Identificación del sexo y evaluación de la inducción hormonal en el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, p. 84.
- Wiley, H. S., Opresko, L. and Wallace, R. A. (1979). New Methods for Purification of Vertebrate Vitellogenin. *Analytical Biochemistry* 97: 145-152.
- Ouchterlony, O. (1949). Antigen-Antibody Reactions in Gels. *Acta Pathologica et Microbiologica. Scandinavica*. 26: 507-515.
- Santillán, O. (2005) Establecimiento de un ELISA para cuantificar la vitelogenina del catán (*attractosteus spatula*). Tesis de licenciatura. UANL, Facultad de Ciencias Biológicas. 66 pp.
- Cortés, V. (2003). Purificación y caracterización de la lipovitulina ovárica de ejemplares adultos de *Atractosteus spatula*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, p. 58.
- Specker, J., and Anderson, T. R. (1994) Developing an ELISA for a Model Protein-Vitellogenin. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 3. Chapter 48. Hochachka and Mommsen Eds. p. 567 - 578.

12. Norberg, B. and Haux, C. (1988). An Homologous Radioimmunoassay for Brown Trout (*Salmo trutta*) Vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry* 5(2): 59-68.
13. Tyler, C. R. and Sumpter, J. P. (1990a). The Purification and Partial Characterization of Carp, *Cyprinus carpio*, Vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry* 8(2): 111-120.
14. Schafhauser-Smith, D. and Benfey, T. J. (2002). The Purification and Development of a Quantitative Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Measurement of Vitellogenin Diploid and Triploid Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 287-298.
15. Yao, Z. and Crim, L. W. (1996). A Biochemical Characterization of Vitellogenin Isolated from the Marine Fish Ocean Pout (*Macrozoarces americanus* L.), Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B(2): 247-253.
16. Bon, E., Barbe, U., Núñez Rodríguez, J., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpter, J. P. and Le Menn, F. (1997). Plasma Vitellogenin Levels During the Annual Reproductive Cycle of the Female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Establishment and Validation of an ELISA. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B(1): 75-84.
17. Hiramatsu, N., Shimizu M., Fukada, H., Kitamura, M., Ura, K., Fuda, H. and Hara, A. (1997). Transition of Serum Vitellogenin Cycle in Sakhalin Taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.* 118C(2): 149-157.
18. Fujita, T., Takemura, A. and Takano, K. (1998). Immunochemical Detection of Precursor Proteins of Yolk and Vitelline Envelope, And their Annual Changes in the Blood of *Diodon holocanthus*. *Journal of Fish Biology* 52: 1229-1240.
19. Heppell, S. A. and Sullivan, C. V. (1999). Gag (*Mycteroperca microlepis*) Vitellogenin: Purification, Characterization and Use for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of Female Maturity in Three Species of Grouper. *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 361-374.
20. Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P., Thybaud, E., Tyler, C. R. and Palazzi, X. (2000). Induction of Fish Vitellogenin and Alterations in Testicular Structure: Preliminary Results of Estrogenic Effects in Chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology* 9: 127-135.
21. Holbech, H., Aandersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard, B., Pedersen, K. L. and Bjerregaard, P. (2001). Development of an ELISA for Vitellogenin in Whole Body Homogenate of Zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 130: 119-131.
22. Kishida, M. and Specker, J. L. (1994). Vitellogenin in the Surface Mucus of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*); Possibility for Uptake by the Free-Swimming Embryos. *The Journal of Experimental Zoology* 268: 259-268.
23. Mañanós, E., Zanuy, S., Le Menn, F., Carrillo, M. and Núñez, J. (1994a). Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Vitellogenin. I-Induction, Purification and Partial Characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(2): 205-216.
24. Susca, V., Corriero, A., Bridges, C. R. and De Metrio, G. (2001). Study of the Sexual Maturity of Female Bluefin Tuna: Purification and Partial Characterization of Vitellogenin and its use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Fish Biology* 58: 815-831.
25. Hennies, M., Wiesmann, M., Allner, B. and Sauerwein, H. (2003). Vitellogenin in Carp (*Cyprinus carpio*) and Perch (*Perca fluviatilis*): Purification, Characterization and Development of an ELISA for the Detection of Estrogenic Effects. *The Science of the Total Environment* 309: 93-103.

26. Chang, C.-F., Lau, E.-L., Lin, B.-Y., and Jeng, S.-R. (1996). Characterization of Vitellogenin Induced by Estradiol 17- $\beta$  in Protandrus Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Fish Physiology and Biochemistry* 15(1): 11-19.
27. Maitre, J. L., Le Guellec, C., Derrien, S., Tenniswood, M. and Valotaire, Y. (1985). Measurement of Vitellogenin from Rainbow Trout by Rocket Immunoelectrophoresis: Application to the kinetic Analysis of Estrogen Stimulation in the Male. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63: 982-987.
28. Copeland, P. A. and Thomas, P. (1988). The Measurement of Plasma Vitellogenin Levels in a Marine Teleost, the Spotted Seatrout (*Cynoscion nebulosus*), by Homologous Radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B(1): 17-23.
29. Núñez Rodríguez, J., Kah, O., Geffard, M. and Le Menn, F. (1989) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Sole (*Solea vulgaris*) Vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B(4): 741-746.
30. Cuisset, B., Pelissero, C., Le Menn, F. and Núñez Rodríguez, J. (1991). ELISA for Siberian Sturgeon (*Acipenser Baeri Brandt*) Vitellogenin. In: *Acipenser*. P. Williot Ed. Cemagref Publ. pp. 107-111
31. Mendoza, R., Guillaume, J.-Ch. and Fauvel, C. (1993). Homologous ELISA Procedure for the Determination of Penaeid Shrimp Vitellogenin. *Aquat. Living. Resour.* 6: 39-48.

*Recibido: 1 de septiembre de 2008*

*Aceptado: 12 de septiembre de 2008*