

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA MARINA

Profesor Patrocinante:

Oscar Goicoechea B. Dr. Sc.
Instituto de Embriología

Profesor copatrocinante:

M. V. Esteban Molinari Labbé
Instituto de Embriología

Profesor Informante:

Rodolfo Amthauer M. Dr. Sc.
Instituto de Bioquímica

**ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE VITELÓGENINA SÉRICAS EN
INDIVIDUOS NEOMACHOS DE TRUCHA ARCOIRIS
Oncorhynchus mykiss (Smith y Stearley, 1989).**

Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para
optar al grado de
Licenciado en Biología Marina

Claudio Neftalí Guzmán Riffo
VALDIVIA -CHILE
2003

A mis padres:

Erwin y Ernestina, gracias por su apoyo e infinito amor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a todos los que me apoyaron en la realización de esta tesis, especialmente al Dr. Oscar Goicoechea, quién no solo me brindó su guía académica en el desarrollo de esta tesis, como mi profesor patrocinante, sino que además me apoyó en el ámbito personal. Gracias doctor.

A mi profesor copatrocinante Esteban Molinari, por su paciencia, buena disposición y apoyo en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Rodolfo Amthauer por haberse comprometido en la corrección y apoyo en partes fundamentales, de esta tesis.

A los profesores Roberto Jaramillo y Orlando Garrido, por sus desinteresadas disposición y ayuda.

A don Valentín Peña, Hernan trujillo , a Magali y don Luchito, por su apoyo y amistad.

Quiero agradecer también, a Marcelo y Verónica, quienes me han brindado siempre su apoyo y cariño.

Finalmente quiero agradecer a todos mis amigos y compañeros con quienes compartí momentos inolvidables que llevaré siempre conmigo.

INDICE

| CONTENIDO | PÁGINA |
|--|--------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 8 |
| 4.1. Animales de Experimentación | 8 |
| 4.2. Reconocimiento de la condición sexual de los peces | 8 |
| 4.3. Técnicas Preparatorias | 11 |
| 4.3.1. Obtención de las muestras | 11 |
| 4.3.2. Obtención del suero sanguíneo | 13 |
| 4.3.3. Anticuerpo empleado en enzimo inmunoensayo | 14 |
| 4.3.4. Estandarización de los reactivos | 14 |
| 4.4. Técnica de análisis | 14 |
| 4.4.1. Determinación de la concentración de proteínas por el método del ácido bicinconínico | 14 |
| 4.4.2. Test de Inmuno Ensayo en placa de policarbonato (ELISA) | 15 |
| 4.4.3. Electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS al 10%..... | 17 |
| 4.5. Preparación de los reactivos específicos | 18 |
| 5. RESULTADOS..... | 19 |
| 5.1. Resultados del análisis de concentración de proteínas totales de las muestras mediante el método del ácido bicinconínico | 19 |
| 5.2. Análisis estadísticos por medio de las pruebas de distribución F y T de Student | 27 |
| 5.3. Resultados obtenidos de los Enzimo Inmunoensayos (ELISA) en microplacas | 30 |
| 5.3.1. Curva de calibración ELISA | 30 |
| 5.3.2. Niveles de Vtg. encontrados en las muestras de sueros de hembras..... | 33 |
| 5.4. Resultados de la Electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS al 10% | 35 |
| 6. DISCUSIÓN | 37 |
| 7. CONCLUSIONES | 41 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 42 |

1. RESUMEN

Debido a la importancia que han adquirido los especímenes neomachos en la producción de poblaciones todo-hembras triploides, se ha hecho cada vez mas necesario investigar la manera de poder reconocer su condición sexual sin la necesidad de sacrificar al pez. Este conocimiento permitiría entregar al acuicultor una herramienta necesaria para el manejo de éstos stoks.

En este estudio se analiza la factibilidad de reconocer a un neomacho de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), por medio de un análisis serológico, basándose en que un neomacho por ser un individuo hembra revertido hormonalmente de sexo, presentaría niveles detectables de la proteína femenina vitelogenina.

Se compararon las concentraciones de proteínas séricas presentes en machos, hembras, neomachos y ejemplares de sexo desconocido pero inmaduros. Para esto se obtuvo muestras de suero sanguíneo de ejemplares de cada grupo a estudiar, a las cuales se les determinó la concentración total de proteínas utilizando el método del ácido bicinconínico. Para determinar los niveles de vitelogenina en las muestras de suero, se utilizó un enzimoimmunoensayo (ELISA).

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por medio de la prueba de distribución F y por el test de Student, los cuales mostraron que, entre neomachos y machos normales no existen diferencias significativas en la cantidad de proteínas totales. Entre neomachos y las hembras se encontró diferencias significativas en el promedio de proteínas totales, igual que entre las hembras y los peces inmaduros, debido a que las hembras presentaban altos niveles de vitelogenina. Los ejemplares inmaduros fueron los que presentaron la menor cantidad de proteínas totales.

No se encontró factible la identificación de neomachos por la presencia de la vitelogenina, ya que sólo los especímenes hembras presentaron niveles detectables de ésta proteína con la técnica usada.

Un estudio preliminar de los perfiles electroforéticos de plasma seminal de machos y sobrenadante de semen de neomachos mostró patrones proteicos diferentes, esta alentadora diferencia, que debería ser confirmada con un mayor número de individuos, permitiría reconocer machos de neomachos.

2. SUMMARY

Since male sex - reversed individuals became important in producing triploid female individuals it is essential to investigate the way to identify their sexual condition without to kill them. This knowledge will allow the salmon farmers to obtain necessary tools for handling the stocks.

In this study we analyse the feasibility to recognize a rainbow trout male sex-reversed (*Oncorhynchus mikis*), by using a blood test, since these genetically females individuals, but reversed by hormones, should exhibit the vitellogenin a female protein.

Also serum proteins levels of male, female, male sex – reversed and immature individuals were compared. With this aim blood serum samples were treated with the Bicinchoninic Acid method in order to estimate the total protein concentration for each sample. Vitellogenin serum levels were estimated by using an ELISA Immuno – Assay.

F test and Student test showed no significant differences between male sex-reversed and normal males total protein levels. Significant differences in the total protein levels were observed between male sex-reversed and female but also between females and immature individuals, since females exhibited high levels of vitellogenin. Immature individuals exhibited the lowest levels of total proteins.

Male sex-reversed individuals were not recognized by vitellogenin ELISA immuno - assay since only females exhibited recordable levels of hormone.

Preliminary studies on the electrophoretic pattern of seminal plasm of males and the floating fraction of male sex-reversed semen exhibited different protein patterns. This difference, which one has to be confirmed by studying a greater number of individuals, would let us to differentiate males from male sex-reversed.

3. INTRODUCCION

No es desconocido el explosivo crecimiento de la acuicultura en nuestro país y su amplia diversificación con varios cultivos de nuevas especies, esto debido a varias razones dentro de las cuales la más importante es el agotamiento de los stocks de los recursos por la sobre pesca, lo que ha provocado vedas y restricciones pesqueras de toda índole para muchas especies. El sector de la acuicultura que ha presentado el mayor crecimiento en las últimas décadas, es la salmonicultura, cuyo desarrollo, junto con toda la red de actividades asociadas que origina, han generado múltiples beneficios económicos y sociales, lo que se refleja en las estadísticas de exportación que muestran un sostenido aumento año tras año. Por ejemplo, entre los meses de Enero y Junio del año 2001 se exportaron 166.683,4 toneladas netas, mientras que durante los mismos meses del año 2002 se exportaron 193.544,5 toneladas netas, lo que representa un 16,12% de aumento con un retorno de divisas de US \$ 455.564.000 FOB (Vidal,2002). Este crecimiento ha llevado a la industria salmonicultora a posicionarse como el segundo productor mundial de salmonídeos en cautiverio después de Noruega. La producción se ha concentrado principalmente entre las regiones décima y décimo segunda, siendo la décima región la que más aporta con un 89% de la producción total. Esto se genera debido a que éstas regiones, especialmente las décima y décimo segunda gozan de excelentes condiciones naturales para el cultivo, por ejemplo: las costas son protegidas con aguas de una profundidad adecuada, las temperaturas de las aguas aseguran un buen crecimiento durante todo el año y las corrientes de las mareas permiten una adecuada renovación del agua. Chile es una nación pesquera establecida y la mayoría de las materias primas necesarias para la producción de alimentos para los peces como la harina y aceite de pescado se obtienen fácilmente. La tradición de procesamiento del pescado, la mano de obra estable y capacitada y la iniciativa de los inversionistas chilenos y extranjeros han expandido la industria rápidamente. En este último tiempo, un sector creciente de las industrias salmonicultoras han investigado en temas relativos a la alimentación en engorda y reproducción. En este

último tema se ha enfatizado en investigaciones en el manejo reproductivo de los salmones a fin de evitar la importante dependencia de parte de la producción nacional a la importación de ovas desde el hemisferio norte.

Procedimientos como la determinación del sexo en forma temprana de los ejemplares que serán los futuros reproductores, permite implementar manejos capaces de optimizar la administración de éstos stocks.

El sexo en los salmonídeos tiene importancia, debido a que los ejemplares machos expresan los cambios fenotípicos de madurez sexual más temprano que los ejemplares hembras, ya que maduran en promedio un año antes (Simpson et al., 1979). Los cambios secundarios causados por la maduración precoz, reducen el valor de mercado y obligan al productor a cosechar el producto antes de que éste haya logrado su crecimiento potencial completo. Por esto, es más conveniente para el acuicultor contar con poblaciones monosexo hembras. Esto se puede lograr, ya que en salmonídeos como en otras especies de peces, es posible usar esteroides para la inducción de la reversión del sexo de hembras. Esto nos permite obtener ejemplares con gametos monosexo, produciendo de ésta manera descendencia para cosecha que no han sido sometidas a tratamiento hormonal.

El neomacho es un individuo genéticamente hembra, cuyo sexo fisiológico ha sido artificialmente revertido y ha desarrollado testículos funcionales. La progenie de estos individuos al cruzarlos con hembras normales origina 100% individuos hembras.

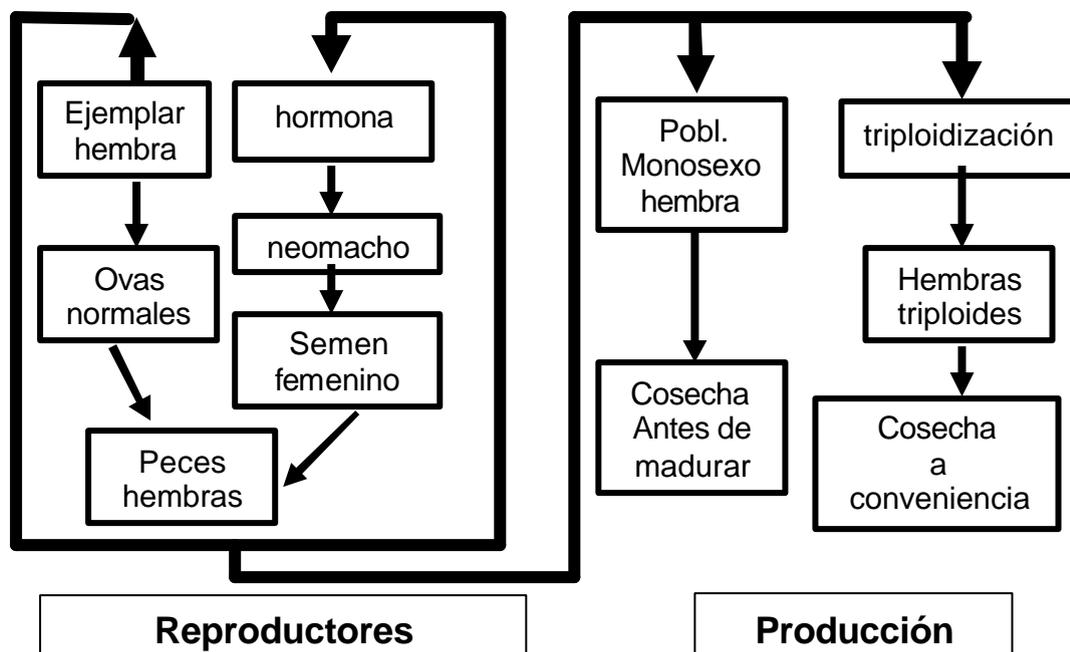
La producción de individuos neomachos, se realiza mediante una técnica hormonal, la cual conduce a la producción de machos fenotípicos a partir de hembras genotípicas (XX) mediante tratamientos con andrógenos. En truchas el periodo sensitivo a esteroides exógenos para influenciar la diferenciación sexual coincide con el comienzo de la diferenciación gonadal, y esta toma lugar entre los días 45 y 55 después de la fertilización (Van den Hurk et al., 1981). El tratamiento más usado es con 17 α -metiltestosterona, la cual puede ser administrada en dos formas: mediante inmersión o por la alimentación. Para administrar la hormona por inmersión, ésta se disuelve en etanol absoluto y, a partir de ésta solución madre se extraen alícuotas

que se adicionan al agua, para así obtener una concentración final de 400 µg/lit del esteroide (Piferret et al., 1989; Johnstone et al., 1978; Goetz et al., 1979; Donaldson et al., 1982). Hunter et al. (1986), han reportado exitosos resultados, en salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), y salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*).

Para administrar la hormona por alimentación ésta es agregada al alimento en una solución de etanol absoluto, el que posteriormente se evapora (Okada, 1973; Jalabert et al., 1975). Según Hunter et al., 1986, se requieren dietas que contengan 3 mg de 17 α -metilt testosterona por kg. de alimento para revertir el sexo a hembras de trucha arcoiris (*O. mykiss*); salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y salmón chinook.

Esta técnica junto con otras como la inducción de peces triploides, que tienen tres juegos de cromosomas, permite generar ejemplares sin desarrollo gonadal, cuya energía está empleada solo para la producción de músculo obviando los órganos sexuales, han podido optimizar notablemente las características productivas (Fig.1). Debido a lo anterior, es muy importante la producción de los neomachos, ya que son el primer paso de esta cadena de optimización productiva.

Fig. 1. Esquema de optimización actual de la producción Salmonídea utilizando planteles todo hembras y triploides



El reconocimiento de neomachos, puede ser sencillo, si se realiza el tratamiento con 17 alfa metiltestosterona en ovas provenientes de poblaciones todo hembras. En peces normales, donde hay peces genéticamente machos y genéticamente hembras, los resultados esperados serían machos normales (XY), y neomachos (XX). En éste caso, es muy difícil reconocer los peces efectivamente revertidos de los macho verdaderos. En todo caso el reconocimiento se realiza cuando los peces llegan a la madurez, observando si presentan restos de ovario en el testículo, o bien presentan testículos globulares y sin conductos espermáticos. Estas son características frecuentes en neomachos, debido a que la gónada se ha desarrollado a partir de un esbozo de gónada que no considera conducto en su patrón morfológico (Johnstone et al., 1979; Bye y Lincoln, 1981; Tsumura y col., 1991). Sin embargo, hoy día se reconoce que es posible obtener neomachos con testículos aparentemente normales y con conductos funcionales, lo que dificultaría su reconocimiento. (Feist et al., 1995; Tsumura et al., 1991; Goicoechea, comunicación personal).

Delgado (1998), propone que es posible realizar reconocimiento de neomachos a través de análisis microscópico del hilio de los testículos, para lo cual es necesario realizar un extendido por presión de la región antero-dorsal del testículo, donde en algunas oportunidades es posible advertir células germinales femeninas.

Los métodos de reconocimiento descritos anteriormente requieren del sacrificio del pez y no le permiten al acuicultor reconocer con un par de meses de anticipación cuales individuos son neomachos en su plantel.

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, el cual a su vez es gatillado por factores ambientales exógenos (Gordon et al, 1987).

En los últimos años, se ha investigado la posibilidad de utilizar la vitelogenina, como un marcador específico para hembras de vertebrados ovíparos que no presentan dimorfismo sexual en las primeras etapas de su desarrollo. Es así como se han perfeccionado métodos como la inmunoaglutinación (LeBail y Breton, 1981); el radioinmunoensayo (Idler et al., 1979; Hara y col., 1983; Benfey et al., 1989); la detección en doble difusión (Gordon y col., 1984), la inmunolectroforesis empleada por Maitre y col., 1985, el dot-blotting reportado por Nitrigual (1996), el cual fue aplicado masivamente por Leal (1996), en salmón coho y en trucha arcoiris, por Gutiérrez (1998).

Recientemente Villanueva (1999), implementó un método inmunocolorimétrico con el propósito de detectar 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.

Según E. Bon, (1997), los neomachos que presentan restos de ovario producen vitelogenina aunque en menor cantidad que las hembras.

El presente trabajo de tesis, explorará la posibilidad de reconocer los neomachos logrados después de tratamientos con 17 alfametiltestosterona, tanto en peces provenientes de ovas todas- hembras como de ovas normales, mediante la detección cuantitativa de vitelogenina sérica basándose en la siguiente hipótesis:

Los neomachos producirían vitelogenina durante la maduración sexual, alcanzando concentraciones detectables en el suero sanguíneo.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Animales de experimentación

Para la realización de ésta tesis, se utilizaron muestras de suero sanguíneo de ejemplares de salmonídeos provenientes de los centros de cultivos que poseen las empresas TRUSAL y NISA en los alrededores de Ralún, y de la piscicultura Hornohuínco de la empresa AQUACULTIVOS S.A., todas ubicadas en la décima región. Las muestras sanguíneas correspondieron a un total de 20 ejemplares hembras, 12 ejemplares machos y 154 de peces neomachos, los cuales fueron seleccionados al azar y obtenidos por reversión del sexo de peces recién eclosionados en estado de alevín con saco vitelino provenientes de una población todo hembra, mediante 10 baños con 17 alfametiltestosterona con una proporción de 400 µg/lit de agua, los cuales se realizaron una vez a la semana y por el tiempo de una hora por vez.

4.2 Reconocimiento de la condición sexual de los peces

Los peces hembras provenían de una población todo hembra de la piscicultura Hornohuínco, las cuales presentaban las características fenotípicas externas propias de las hembras.

Los ejemplares machos provenían de una población normal perteneciente a la piscicultura de Ralún de la empresa NISA y su condición sexual fue reconocida por sus caracteres fenotípicos externos propios de los machos, como la presencia de una deformación típica de la mandíbula y además porque a la presión abdominal se producía evacuación de semen.

Los neomachos se reconocieron por observación directa de las gónadas, para lo cual los peces fueron sacrificados por traumatismo encefálico, luego se les realizó un corte medio ventral del cuerpo, que se iniciaba por delante de la abertura cloacal y

termina a nivel de las aletas pectorales por la zona ventral.

Para un mejor análisis los neomachos, según el grado de diferenciación del aparato reproductor fueron clasificados en 4 grupos:

1º grupo: Peces con testículos de forma globular o lobulados con presencia de ambos conductos espermáticos, uno con salida y el otro sin salida.

2º grupo: Peces con testículos de forma globular o lobulados con presencia de ambos conductos espermáticos ambos sin salida.

3º grupo: Peces con testículos de forma globular o lobulados y ausencia de conductos espermáticos (Fig.2y 3).

4º grupo: neomachos que presentan testículos y restos de ovario (Fig.4 y 5).

Aquellos especímenes que no presentaron desarrollo gonadal fueron rotulados como inmaduros.

Fig. 2. Neomacho con testículo sin presencia de conductos espermáticos

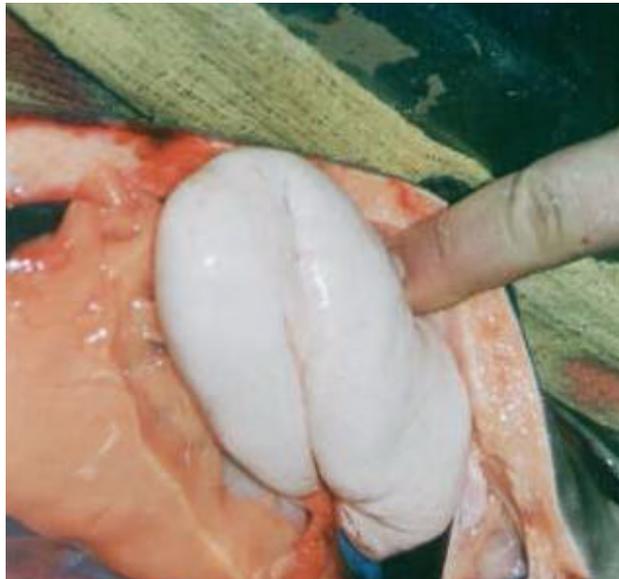


Fig. 3. Neomachos con testículo sin presencia de conductos espermáticos

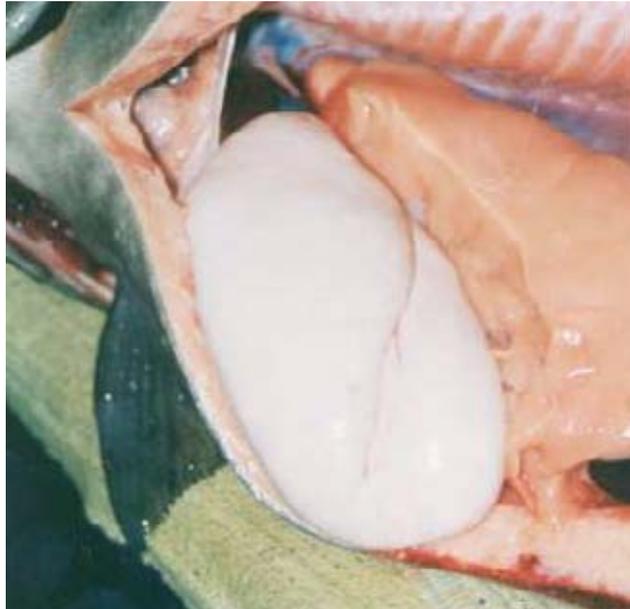


Fig.4. neomachos con presencia de ovario con óvulos y testículo mediano con conducto espermático. Ovario (ov), testículo (te), conducto espermático(co).

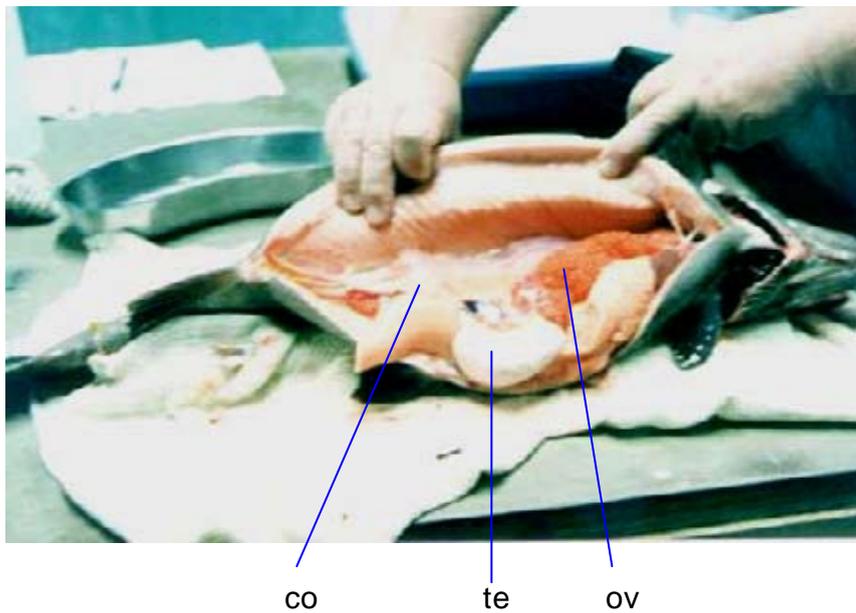
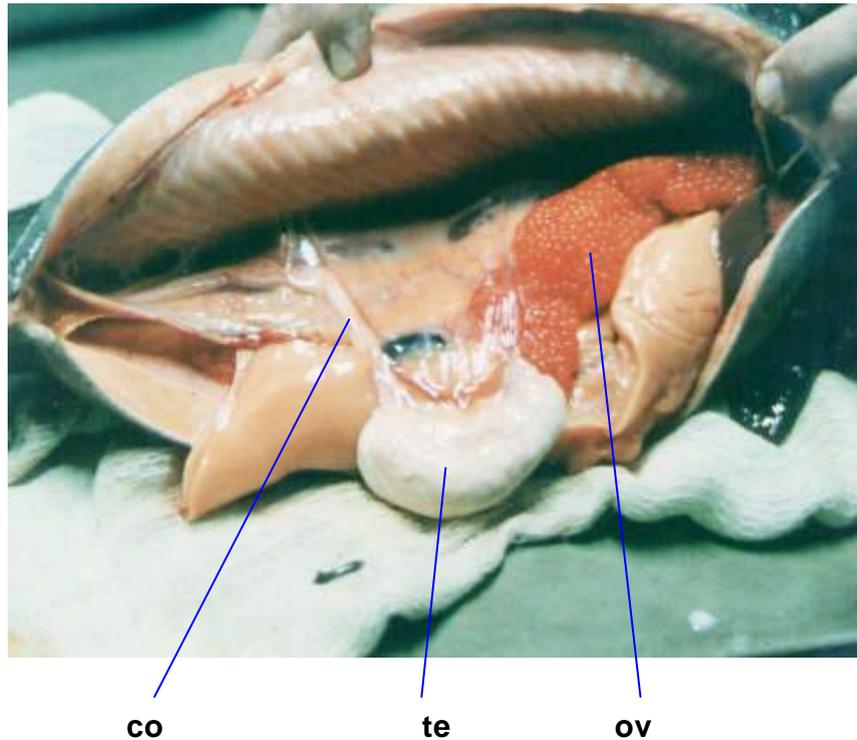


Fig.5. neomachos con presencia de ovario con óvulos y testículo mediano con conducto espermático. Ovario (ov), testículo (te), conducto espermático(co).



4.3 Técnicas preparatorias

4.3.1 Obtención de las muestras de sangre.

Para la obtención de las muestras, los peces seleccionados fueron trasladados desde sus estanques a un contenedor donde fueron anestesiados con benzocaina líquida (Verterquímica), disuelta en agua en una concentración aprox. de 15 a 20 ml por cada 100 litros de agua. Cada pez fue marcado en un opérculo con un autocrotal de aluminio (Finfish Gill Tags, Ketchum, Canadá), para su posterior identificación (Fig. 6 y 7), Luego se les extrajo aproximadamente 1 ml de sangre obtenida mediante punción de la vena caudal bajo la línea lateral del pez y a nivel de la zona media de la aleta anal con una jeringa esterilizada de 3 ml (Fig. 8), y depositada en tubos

Eppendorf de 1.5 ml rotulados con el mismo número del crotal, los cuales fueron depositados en una caja de aislapol con hielo y trasladados hacia el instituto de Embriología de la Universidad Austral de Chile, para su posterior análisis.

Fig. 6 y 7. Proceso de marcación del pez con un autocrotal de aluminio en el opérculo



Fig. 8. Procedimiento de toma de muestra de sangre del pez en una cantidad aproximada de 1 ml con punción de la vena caudal bajo la línea lateral del pez y a nivel de la zona media de la aleta anal.



4.3.2 Obtención del suero sanguíneo.

Una vez en el instituto, las muestras se dejaron reposar por 24 hrs. a temperatura ambiente, para que se forme el coágulo y se separe el suero del plasma sanguíneo, para ayudar a este fin los tubos fueron centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos. Finalmente, el sobrenadante obtenido, el cual corresponde al suero, fue trasvasijado a nuevos tubos Eppendorf los cuales conservaron la numeración original y fueron almacenados a -20°C para su posterior análisis.

4.3.3 Anticuerpo empleado en Enzimo Inmunoensayo.

El anticuerpo anti-vitelo de coho utilizado, correspondió a suero del conejo 41, inmunizado con extracto crudo de ovario inmuoabsorvido por suero de macho de coho, según procedimiento utilizado por Nitrigual (1996), Leal (1996) y Villanueva (1999).

4.3.4 Estandarización de los reactivos.

Las diluciones óptimas de los antisueros: anti-vitelo y anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (GibcoBRL), son las recomendadas por Villanueva, (1999); o sea, 1200 y 1000 veces diluidos respectivamente. La dilución óptima del suero problema fue determinada mediante ensayo-error, obteniendo los mejores resultados al diluirlo 500 veces.

4.4 Técnicas de análisis

4.4.1 Determinación de la concentración de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA).

Para la determinación de la concentración total de proteínas presente en las muestras de suero, se realizó el método del ácido bicinconínico. Se utilizó un kit comercial (Pierce), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante ligeramente modificado a la mitad de los volúmenes sugeridos en el protocolo original (comunicación personal Dr. R. Amthauer).

- Se construyó una curva de calibración, con seroalbúmina de bovino (BSA) para un rango de concentración proteica de 0 a 2 mg/ml.
- A un volumen de 50 ul de muestra problema contenida en un tubo Eppendorf, se le agregó 1 ml de mezcla reactiva de color verdoso (solución de Sulfato de cobre

II 4 % pentahidratada + solución de ácido bicinconínico), agitar (color vira a un púrpura suave).

- Se realizó una réplica usando 25 ul de muestra completando a 50 ul con agua destilada.
- Se incubó por 5 min. a 50°C (se obtiene un color púrpura más marcado).
- La reacción se detuvo sumergiendo los tubos con las muestras en hielo por 2 min.
- La absorbancia fue leída en un espectrofotómetro Spectronic-21 modelo DUV. a una longitud de onda de 562 nm.
- La lectura obtenida se interpola en la curva de calibración y se obtiene la concentración de proteínas de la muestra, de la misma forma se realiza para la réplica, el promedio de ambos resultados nos da el valor final de la concentración proteica de la muestra problema.

Este método se basa en la combinación de 2 reacciones: en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} realizada por las proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret), con la alta sensibilidad en la detección colorimétrica selectiva del catión cuproso (Cu^{+1}) usando el reactivo de ácido bicinconínico. La reacción púrpura final, característica de éste ensayo es formada por la quelación de 2 moléculas de ácido bicinconínico con un ión cuproso y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. que es lineal con el incremento de la concentración proteica en un rango de 20 a 2000 ng/ml

4.4.2 Test de Inmuno Ensayo en placa de policarbonato (ELISA).

Para la cuantificación de la vitelogenina, se usó el test inmunocolorimétrico por el método ELISA en microplacas de policarbonato (NUNC). Esta técnica consta de los siguientes pasos:

a) Inmovilización del antígeno en la placa:

- Para fijar el antígeno en los posillos de las microplacas de policarbonato (NUNC) se depositaron 100 ul de las muestras de suero, previamente diluidas 1/500 en buffer carbonato pH 7,8 y se incubaron por 1 hr. a temperatura ambiente.

- Los pocillos fueron lavados 3 veces con 200 ul. de buffer tris pH 7,8 por 5 min. c/u eliminando así el antígeno que no se unió a la placa.

b) Bloqueo de la placa:

- Los sitios de unión libres en las paredes de los pocillos fueron bloqueados con 200 ul de leche descremada al 5% por 1 hr. y a temperatura ambiente.
- Para eliminar los restos de leche descremada se lavaron 3 veces los pocillos con 200 ul de buffer tris pH 7,8 por 5 min. c/u

c) Adición e incubación del 1º anticuerpo:

- Se añadieron 100 ul del anticuerpo anti-vitelo diluido 1/1200 en suero de salmón coho macho y se incubaron por 2 hrs. a temperatura ambiente con agitación constante.
- Terminada la incubación se eliminó el anticuerpo libre y los pocillos fueron lavados 3 veces con 200 ul de buffer tris pH 7,8 por 5 min. c/u.

d) Adición e incubación del 2º anticuerpo:

- Se añadieron 100 ul del 2º anticuerpo (anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina GibcoBRL, diluido 1/1000 en buffer carbonato pH 9,6 y se dejó incubar por 1 hr. a temperatura ambiente con agitación.
- El exceso del 2º anticuerpo se eliminó y se lavaron los pocillos 3 veces con 200 ul de buffer tris pH 7,8 por 5 min. c/u

e) Revelado y lectura:

- Se reveló la reacción añadiendo 100 ul de sustrato soluble (paranitrofenilfosfato diluido en buffer IAP), se dejó desarrollar por 10 min. a temperatura ambiente y en oscuridad.
- La reacción se detuvo con NaOH (67 ul si se usa al 5 M).
- La absorbancia fue leída en un lector de microplaca Rosys anthos 2010 con software versión V 1.7a a una longitud de 405 nm.

4.4.3 Electroforesis de geles de poliacrilamida - SDS al 10% según la técnica descrita por Laemmli (1970).

Debido a que nuestro intento de reconocer peces neomachos, mediante detección y cuantificación de vitelogenina en suero sanguíneo no fue exitoso, se realizó un ensayo preliminar para intentar diferenciar los machos de los neomachos a partir de los patrones proteicos contenidos en el plasma seminal de peces machos normales y sobrenadantes de semen de peces neomachos. Para esto, se recolectaron muestras de semen de machos normales por presión abdominal y el semen de neomacho se recolectó después de sacrificado y analizado el pez. Las muestras se trasladaron hasta el instituto de Embriología, dentro de frascos de cultivo en cajas de aislapol con hielo. El plasma seminal de peces machos normales y los sobrenadantes de semen de peces neomachos, se obtuvieron por centrifugación a 10000 rpm. por 10 min. Luego se enviaron muestras al Instituto de Bioquímica, donde fueron realizadas electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970).

Se utilizó un gel separador al 12% (p/v) (7 cm) con un grado de entrecruzamiento de 2.7%, en solución tampón Tris-HCL 0.375 M, pH 8,8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1% (p/v), persulfato de amonio 0.03% (p/v) y N,N,N'-tetramethylethylenediamina (TEMED) 0.1 (v/v). Sobre éste se polimerizó un gel espaciador al 4% (p/v) (2 cm) conteniendo Tris-HCL 0.125 M, pH 6,8, SDS, persulfato de amonio y TEMED como se mencionó anteriormente. Las muestras de proteínas fueron disueltas en un tampón de muestra, con las siguientes concentraciones finales: Tris-HCL 62.5 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol como marcador de frente iónico y calentadas a 95 °C por 2-3 minutos. Luego de cargar las muestras al gel, la electroforesis se condujo por aplicación constante de 6-8 mA hasta que el frente iónico alcanzó el final del gel (aproximadamente 12hrs.). El tampón de electrodos contenía Tris-HCL 25mM, Glicina 0.19 M y SDS 0.1% (p/v). Concluida la electroforesis, el gel se fijó en una solución de isopropanol 25% (v/v) y ácido acético 10% (v/v), durante 1 hr. y

posteriormente se tiñó en una solución de azul de Coomassie R-250 0.3% (p/v), metanol 50% (v/v), de ácido acético 10% (v/v). El gel fue desteñado mediante lavados repetidos con una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 7% (v/v).

4.5 Preparación de los reactivos específicos.

- Tris buffer salino (TBS) :

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 1,5 gr.

K H₂ PO₄ 0,48 gr.

NaCl 7 gr.

Tris 5 gr.

Completar con agua destilada a 1000 ml y ajustar el pH final a 7,8 con HCl.

- Buffer fosfatasa alcalina intestinal (IAP):

DEA (Dietilamina 1M)..... 20 ml

MgCl₂ 0.04 gr.

Completar con agua destilada a 100 ml Y ajustar a pH 9.8, luego completar a 200 ml
Con agua destilada.

- Solución de revelado de la actividad de la fosfatasa alcalina GibcoBRL.:

p-npp (paranitrofenilfosfato).....100 Mg.

Agregar buffer IAP hasta completar 20 ml (evitar lo mas posible el contacto de éste reactivo con la luz).

5 RESULTADOS.

5.1 Resultados del análisis de concentración de proteínas totales de las muestras mediante el método del ácido bicinconínico.

Los resultados de cada grupo de peces están expresados en las siguientes tablas:

Tabla 1. Resultado del análisis de proteínas totales en truchas machos normales y su estadística descriptiva.

| Procedencia | Fecha de Recolección | Proteína tot. (mg/ml) |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| NISA | 04-08-2000 | 61.3 |
| NISA | 04-08-2000 | 42.6 |
| NISA | 04-08-2000 | 48.6 |
| NISA | 04-08-2000 | 66.4 |
| NISA | 04-08-2000 | 45.9 |
| NISA | 04-08-2000 | 67.5 |
| NISA | 04-08-2000 | 59.8 |
| NISA | 04-08-2000 | 44.7 |
| NISA | 04-08-2000 | 64.0 |
| NISA | 04-08-2000 | 66.8 |
| NISA | 17-06-2000 | 55.7 |
| NISA | 17-06-2000 | 53.0 |
| Valor promedio | | 56,358 |

| Estadística Descriptiva | |
|-------------------------|------------|
| Desviación estándar | 9,22027986 |
| Varianza de la muestra | 85,0135606 |
| Mínimo | 42,6 |
| Máximo | 67,5 |
| Suma | 676,3 |
| Cuenta | 12 |

Tabla 2. Resultado del análisis de proteínas totales en truchas hembras normales y su estadística descriptiva.

| Procedencia | Fecha de Recolección | Proteína tot. (mg/ml) |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 62,7 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 58,5 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 59,6 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 57,7 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 57,3 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 54,9 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 60,7 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 60,4 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 54,3 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 68,6 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 72,7 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 70,6 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 70,1 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 74,1 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 71,5 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 61,1 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 56,2 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 63,7 |
| NISA | 31-08-2000 | 50,9 |
| NISA | 31-08-2000 | 56,9 |
| Valor promedio | | 62,125 |

| Estadística Descriptiva | |
|-------------------------|------------|
| Desviación estándar | 6,85779426 |
| Varianza de la muestra | 47,0293421 |
| Mínimo | 50,9 |
| Máximo | 74,1 |
| Suma | 1242,5 |
| Cuenta | 20 |

Tabla 3. Resultado del análisis de proteínas totales en neomachos 1:
Con testículos con un conducto espermático abierto y el otro cerrado.

| Procedencia | Fecha de Recolección | Proteína tot. (mg/ml) |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| NISA | 27-05-2000 | 57.5 |
| NISA | 27-05-2000 | 49.3 |
| NISA | 28-07-2000 | 43.6 |
| NISA | 28-07-2000 | 51.5 |
| NISA | 04-08-2000 | 46.3 |
| TRUSAL | 27-05-2000 | 42.4 |
| TRUSAL | 14-04-2000 | 61.7 |
| Valor promedio | | 50,328 |

| Estadística Descriptiva | |
|--------------------------------|------------|
| Desviación estándar | 7,15930962 |
| Varianza de la muestra | 51,2557143 |
| Mínimo | 42,4 |
| Máximo | 61,7 |
| Suma | 352,3 |
| Cuenta | 7 |

Tabla 4. Resultado del análisis de proteínas totales en neomachos 2:
Con testículos con ambos conductos espermáticos
Cerrados.

| Procedencia | Fecha recolección. | Prot. (mg/ml) | Procedencia | Fecha recolección. | Prot. (mg/ml) |
|-------------|--------------------|---------------|-------------|--------------------|---------------|
| Nisa | 27-05-2000 | 54.4 | Trusal | 16-06-2000 | 67.4 |
| Nisa | 27-05-2000 | 66.3 | Trusal | 16-06-2000 | 61.1 |
| Nisa | 27-05-2000 | 54.6 | Trusal | 16-06-2000 | 53.0 |
| Nisa | 27-05-2000 | 63.8 | Trusal | 16-06-2000 | 49.0 |
| Nisa | 27-05-2000 | 55.7 | Trusal | 16-06-2000 | 53.1 |
| Nisa | 27-05-2000 | 67.5 | Trusal | 16-06-2000 | 52.2 |
| Nisa | 27-05-2000 | 62.9 | Aquac. | 27-05-2000 | 53.1 |
| Nisa | 27-05-2000 | 67.5 | Aquac. | 27-05-2000 | 56.3 |
| Nisa | 27-05-2000 | 53.9 | Aquac. | 27-05-2000 | 55.9 |
| Nisa | 27-05-2000 | 60.8 | Aquac. | 27-05-2000 | 46.2 |
| Nisa | 27-05-2000 | 54.3 | Aquac. | 27-05-2000 | 51.7 |
| Nisa | 27-05-2000 | 55.9 | Nisa | 28-07-2000 | 54.7 |
| Nisa | 27-05-2000 | 50.3 | Nisa | 28-07-2000 | 44.9 |
| Nisa | 27-05-2000 | 63.6 | Nisa | 28-07-2000 | 61.7 |
| Nisa | 27-05-2000 | 58.3 | Nisa | 28-07-2000 | 69.0 |
| Nisa | 27-05-2000 | 46.8 | Nisa | 28-07-2000 | 53.3 |
| Nisa | 27-05-2000 | 52.1 | Nisa | 04-08-2000 | 62.2 |
| Nisa | 27-05-2000 | 60.3 | Nisa | 04-08-2000 | 67.4 |
| Nisa | 27-05-2000 | 45.7 | Nisa | 11-08-2000 | 44.3 |
| Nisa | 27-05-2000 | 47.7 | Nisa | 11-08-2000 | 51.2 |
| Nisa | 27-05-2000 | 45.5 | Nisa | 11-08-2000 | 51.8 |
| Trusal | 27-05-2000 | 66.9 | Nisa | 11-08-2000 | 56.1 |
| Trusal | 27-05-2000 | 69.1 | Nisa | 11-08-2000 | 54.7 |
| Trusal | 27-05-2000 | 59.6 | Nisa | 11-08-2000 | 46.5 |
| Trusal | 27-05-2000 | 65.5 | Nisa | 11-08-2000 | 51.1 |

Continuación tabla 4

| Procedencia | Fecha recolección | Prot. (mg/ml) | Procedencia | Fecha recolección. | Prot. (mg/ml) |
|-----------------------|-------------------|---------------|-------------|--------------------|---------------|
| Trusal | 27-05-2000 | 55.3 | Trusal | 16-06-2000 | 54.8 |
| Trusal | 27-05-2000 | 61.2 | Nisa | 11-08-2000 | 53.6 |
| Trusal | 27-05-2000 | 52.6 | Nisa | 11-08-2000 | 56.6 |
| Trusal | 27-05-2000 | 59.3 | Nisa | 11-08-2000 | 45.9 |
| Trusal | 27-05-2000 | 55.3 | Nisa | 31-08-2000 | 54.0 |
| Aquac. | 16-06-2000 | 55.8 | Nisa | 31-08-2000 | 65.6 |
| Aquac. | 16-06-2000 | 46.2 | Nisa | 31-08-2000 | 55.6 |
| Trusal | 16-06-2000 | 60.3 | Nisa | 31-08-2000 | 65.0 |
| Trusal | 16-06-2000 | 51.1 | Nisa | 05-09-2000 | 41.1 |
| Trusal | 16-06-2000 | 57.1 | Nisa | 05-09-2000 | 52.6 |
| Trusal | 16-06-2000 | 59.8 | Trusal | 05-09-2000 | 41.0 |
| Valor promedio | | | | 55,78 | |

| Estadística descriptiva | |
|--------------------------------|------------|
| Desviación estándar | 7,02562713 |
| Varianza de la muestra | 49,3594366 |
| Mínimo | 41 |
| Máximo | 69,1 |
| Suma | 4016,4 |
| Cuenta | 72 |

Tabla 5. Resultado del análisis de proteínas totales en neomachos 3:
Con testículos sin presencia de conductos espermáticos.

| Procedencia | Fecha recolección. | Prot. (mg/ml) |
|-----------------------|--------------------|---------------|
| NISA | 27-05-2000 | 48.8 |
| NISA | 27-05-2000 | 49.9 |
| NISA | 27-05-2000 | 52.2 |
| NISA | 27-05-2000 | 63.7 |
| NISA | 27-05-2000 | 62.2 |
| NISA | 27-05-2000 | 64 |
| NISA | 27-05-2000 | 50.9 |
| NISA | 27-05-2000 | 70.4 |
| NISA | 27-05-2000 | 69.8 |
| NISA | 27-05-2000 | 62.2 |
| NISA | 27-05-2000 | 60.9 |
| NISA | 16-06-2000 | 51.9 |
| NISA | 16-06-2000 | 51.7 |
| TRUSAL | 16-06-2000 | 45.2 |
| TRUSAL | 16-06-2000 | 48.2 |
| TRUSAL | 16-06-2000 | 41.3 |
| TRUSAL | 16-06-2000 | 60.1 |
| TRUSAL | 16-06-2000 | 53.1 |
| TRUSAL | 27-05-2000 | 43.3 |
| TRUSAL | 27-05-2000 | 47.2 |
| TRUSAL | 27-05-2000 | 49.7 |
| Valor promedio | | 54,604 |

| Estadística Descriptiva | |
|--------------------------------|-----------|
| Desviación estándar | 8,4944379 |
| Varianza | 72,155476 |
| Mínimo | 41,3 |
| Máximo | 70,4 |
| Suma | 1146,7 |
| Cuenta | 21 |

Tabla 6. Resultado del análisis de proteínas totales en neomachos 4:
Con testículos y con presencia de ovario.

| Procedencia | Fecha recolección. | Prot. (mg/ml) |
|-----------------------|--------------------|---------------|
| NISA | 27-05-2000 | 47.6 |
| NISA | 27-05-2000 | 58.6 |
| NISA | 27-05-2000 | 50.5 |
| NISA | 27-05-2000 | 48.4 |
| NISA | 27-05-2000 | 59.8 |
| NISA | 27-05-2000 | 54.2 |
| NISA | 27-05-2000 | 49.0 |
| NISA | 27-05-2000 | 56.1 |
| NISA | 27-05-2000 | 51.7 |
| TRUSAL | 16-06-2000 | 63.2 |
| TRUSAL | 16-06-2000 | 63.8 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 52.3 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 64.1 |
| NISA | 28-07-2000 | 50.9 |
| NISA | 28-07-2000 | 42.3 |
| NISA | 28-07-2000 | 63.9 |
| NISA | 04-08-2000 | 58.7 |
| NISA | 11-08-2000 | 58.0 |
| NISA | 11-08-2000 | 61.2 |
| NISA | 31-08-2000 | 57.7 |
| NISA | 31-08-2000 | 53.6 |
| NISA | 31-08-2000 | 54.4 |
| NISA | 31-08-2000 | 64.2 |
| Valor promedio | | 55,834 |

| Estadística Descriptiva | |
|--------------------------------|------------|
| Desviación estándar | 6,15981174 |
| Varianza | 37,9432806 |
| Mínimo | 42,3 |
| Máximo | 64,2 |
| Suma | 1284,2 |
| Cuenta | 23 |

Tabla 7. Resultado del análisis de proteínas totales en especímenes Inmaduros.

| Procedencia | Fecha recolección. | Prot. (mg/ml) |
|-----------------------|--------------------|---------------|
| NISA | 27-05-2000 | 50.8 |
| NISA | 27-05-2000 | 41.5 |
| NISA | 27-05-2000 | 36.9 |
| NISA | 27-05-2000 | 47.7 |
| NISA | 27-05-2000 | 56.3 |
| NISA | 27-05-2000 | 44.7 |
| NISA | 27-05-2000 | 44.1 |
| NISA | 27-05-2000 | 37.8 |
| NISA | 27-05-2000 | 51.5 |
| NISA | 28-07-2000 | 47.1 |
| NISA | 28-07-2000 | 31.7 |
| NISA | 04-08-2000 | 65.5 |
| NISA | 31-08-2000 | 38.5 |
| NISA | 31-08-2000 | 36.0 |
| NISA | 31-08-2000 | 43.3 |
| NISA | 31-08-2000 | 40.3 |
| NISA | 31-08-2000 | 34.5 |
| NISA | 31-08-2000 | 30.8 |
| NISA | 31-08-2000 | 63.1 |
| NISA | 31-08-2000 | 32.9 |
| NISA | 31-08-2000 | 42.0 |
| NISA | 31-08-2000 | 48.9 |
| NISA | 31-08-2000 | 56.0 |
| NISA | 31-08-2000 | 54.1 |
| NISA | 31-08-2000 | 51.2 |
| NISA | 31-08-2000 | 44.3 |
| NISA | 31-08-2000 | 42.6 |
| NISA | 31-08-2000 | 40.7 |
| NISA | 05-09-2000 | 27.6 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 46.7 |
| Aquacultivos | 25-06-2000 | 25.8 |
| Valor promedio | | 43.706 |

| Estadística Descriptiva | |
|-------------------------|------------|
| Desviación estándar | 9,64499647 |
| Varianza | 93,025957 |
| Mínimo | 25,8 |
| Máximo | 65,5 |
| Suma | 1354,9 |
| Cuenta | 31 |

Tabla 8. Resumen de los resultados del análisis de proteínas totales en los diferentes grupos de peces.

| Grupos de peces | Nº de peces | Varianza | Desviación estándar | Conc. promedio Prot. totales. (mg/ml.) |
|--|--------------------|-----------------|----------------------------|---|
| Machos normales | 12 | 85,014 | 9,22 | 56,358 |
| Hembras normales | 20 | 47,029 | 6,86 | 62,125 |
| Neomachos 1: con testículos globulares o lobulados con un conducto espermático abierto y el otro cerrado. | 7 | 51,255 | 7,16 | 50,328 |
| Neomachos 2: con testículos globulares o lobulados con ambos conductos espermáticos cerrados | 72 | 49,359 | 7,03 | 55,78 |
| Neomachos 3: con testículos globulares o lobulados sin presencia de conductos espermáticos. | 21 | 72,155 | 8,49 | 54,604 |
| Neomachos 4: con testículos globulares o lobulados y con presencia de ovario | 23 | 37,943 | 6,16 | 55,834 |
| especímenes Inmaduros | 31 | 93,026 | 9,64 | 43,706 |

5.2 Análisis estadístico por medio de las pruebas de distribución F y T de Student de los resultados obtenidos de proteínas totales.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de peces, se realizó un análisis estadístico a los valores obtenidos de varianzas y medias, para lo cual se les aplicó la prueba de distribución F y la prueba T de Student, respectivamente (tabas 9 y 10).

Tabla 9. Resultados del análisis de varianzas por medio de la prueba de distribución F

| Grupos de peces | Grados de libertad | Valor F | Valor F Crítico | P(Fcrit. <= F) |
|---------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| Macho v/s Hembra | 11 y 19 | 1.807671 | 2.3401 | Sin diferencia |
| Macho v/s neomacho 1 | 11 y 6 | 1.658616 | 4.0274 | Sin diferencia |
| Macho v/s neomacho 2 | 11 y 71 | 1.720079 | 1.9262 | Sin diferencia |
| Macho v/s neomacho 3 | 11 y 20 | 1.1782 | 2.3099 | Sin diferencia |
| Macho v/s neomacho 4 | 11 y 22 | 2.240543 | 2.2585 | Sin diferencia |
| Macho v/s inmaduros | 11 y 30 | 1.094248 | 1.7943 | Con diferencia |
| Hembra v/s neomacho 1 | 19 y 6 | 1.089867 | 2.8419 | Sin diferencia |
| Hembra v/s neomacho 2 | 19 y 71 | 1.050923 | 1.5345 | Sin diferencia |
| Hembra v/s neomacho 3 | 19 y 20 | 1.534265 | 1.8021 | Sin diferencia |
| Hembra v/s neomacho 4 | 19 y 22 | 1.239464 | 2.0836 | Sin diferencia |
| Hembra v/s inmaduros | 19 y 30 | 1.978041 | 1.6763 | Con diferencia |
| Neomacho 1 v/s neomacho 2 | 6 y 71 | 1.037057 | 2.2292 | Sin diferencia |
| Neomacho 1 v/s neomacho 3 | 6 y 20 | 1.407755 | 2.0913 | Sin diferencia |
| Neomacho 1 v/s neomacho 4 | 6 y 22 | 1.350851 | 2.5490 | Sin diferencia |
| Neomacho 1 v/s inmaduros | 6 y 30 | 1.814938 | 1.9803 | Sin diferencia |
| Neomacho 2 v/s neomacho 3 | 71 y 20 | 1.459922 | 1.6666 | Sin diferencia |
| Neomacho 2 v/s neomacho 4 | 71 y 22 | 1.302581 | 1.8738 | Sin diferencia |
| Neomacho 2 v/s inmaduros | 71 y 30 | 1.882194 | 1.5259 | Con diferencia |
| Neomacho 3 v/s neomacho 4 | 20 y 22 | 1.901666 | 2.0706 | Sin diferencia |
| Neomacho 3 v/s inmaduros | 20 y 30 | 1.289243 | 1.6673 | Sin diferencia |
| neomacho 4 v/s inmaduros | 22 y 30 | 2.451711 | 1.6513 | Con diferencia |

La prueba señala que existe diferencias significativas entre los grupos cuando se cumple que: **F crítico <= F**

Tabla 10 . Resultados del análisis de los valores de las medias por medio de la prueba T Student

| Grupos de peces | Grados de libertad | Valor t | Valor t Crítico | P(tcrit. <= t) |
|---------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| Macho v/s Hembra | 18 | -1.877294 | 2.1009 | Sin diferencia |
| Macho v/s neomacho 1 | 15 | 1.588611 | 1.7530 | Sin diferencia |
| Macho v/s neomacho 2 | 13 | 0.204773 | 1.7709 | Sin diferencia |
| Macho v/s neomacho 3 | 21 | 0.540637 | 1.7207 | Sin diferencia |
| Macho v/s neomacho 4 | 16 | 0.177152 | 1.7458 | Sin diferencia |
| Macho v/s inmaduros | 21 | 3.983920 | 1.7207 | Con diferencia |
| Hembra v/s neomacho 1 | 10 | 3.792747 | 1.8124 | Con diferencia |
| Hembra v/s neomacho 2 | 31 | 3.636052 | 1.6955 | Con diferencia |
| Hembra v/s neomacho 3 | 38 | 3.125994 | 1.6859 | Con diferencia |
| Hembra v/s neomacho 4 | 39 | 3.144646 | 1.6848 | Con diferencia |
| Hembra v/s inmaduros | 48 | 7.961318 | 1.6772 | Con diferencia |
| Neomacho 1 v/s neomacho 2 | 7 | -1.928975 | 1.8945 | Sin diferencia |
| Neomacho 1 v/s neomacho 3 | 12 | -1.303727 | 1.7822 | Sin diferencia |
| Neomacho 1 v/s neomacho 4 | 9 | -1.838270 | 1.8331 | Sin diferencia |
| Neomacho 1 v/s inmaduros | 12 | 2.061068 | 1.7822 | Sin diferencia |
| Neomacho 2 v/s neomacho 3 | 28 | 0.582522 | 1.7011 | Sin diferencia |
| Neomacho 2 v/s neomacho 4 | 42 | -0.03093 | 1.6819 | Sin diferencia |
| Neomacho 2 v/s inmaduros | 44 | 6.291457 | 1.6802 | Con diferencia |
| Neomacho 3 v/s neomacho 4 | 36 | -0.54542 | 1.6882 | Sin diferencia |
| Neomacho 3 v/s inmaduros | 47 | 4.29559 | 1.6779 | Con diferencia |
| neomacho 4 v/s inmaduros | 51 | 5.62404 | 1.6752 | Con diferencia |

La prueba señala que existe diferencias significativas entre los grupos cuando se cumple que: **t crítico <= t**

5.3. Resultados del test de ELISA en las muestras.

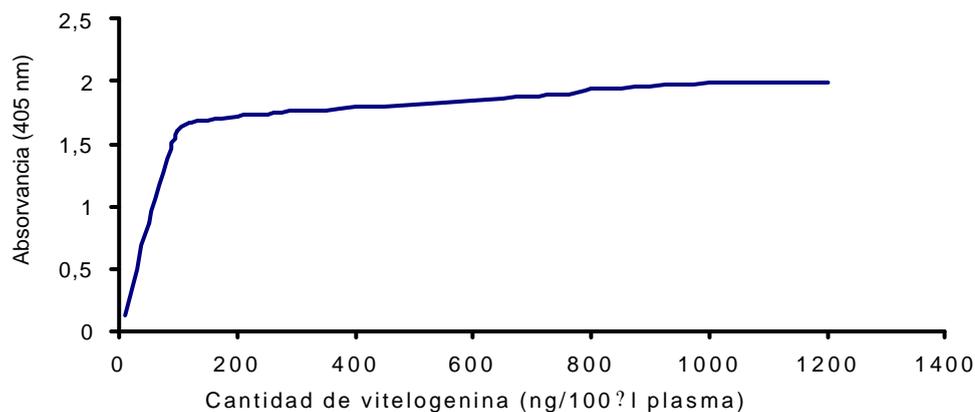
5.3.1 Establecimiento de una curva ELISA estándar.

Se procedió a realizar una curva, absorbancia (405nm.) v/s cantidad de vitelogenina (Vtg.), para lo cual se contó con una muestra de vitelogenina purificada mediante el protocolo descrito por Wiley y col. (1979) y desarrollado por Villanueva (1999), la que fue conservada congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. de ésta muestra stock, de concentración conocida, se realizó una serie de diluciones (tabla 11). Mediante el test ELISA, se obtuvo las absorbancias correspondientes a cada concentración y con ellas se construyó un gráfico (Fig. 9) que muestra una curva del tipo normal, en la que las concentraciones de vtg utilizadas, muestran absorbancias que producen una curva que presenta dos claros segmentos, uno exponencial que comprende entre los 10 ng de Vtg. por 1ul suero hasta 100 ng de vtg. por 1ul suero. Concentraciones superiores produjeron un segmento estacional de curva que representa las ω concentraciones que están por fuera del límite discriminatorio de la espectrofotométrica. Por lo que para construir la curva ELISA estándar, se consideraron diluciones comprendidas en el segmento de la curva que se comporta logarítmicamente.

Tabla 11. Absorbancia de la serie de diluciones de Vtg.

| Vtg. (ng/100 ul plasma) | Abs. (405 nm) | Vtg. (ng/100 ul plasma) | Abs. (405 nm) | Vtg. (ng/100 ul plasma) | Abs. (405 nm) |
|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| 10 | 0,126 | 450 | 1,8 | 900 | 1,965 |
| 50 | 0,863 | 500 | 1,815 | 950 | 1,969 |
| 100 | 1,603 | 550 | 1,826 | 1000 | 1,987 |
| 150 | 1,688 | 600 | 1,843 | 1050 | 1,989 |
| 200 | 1,721 | 650 | 1,864 | 1100 | 1,996 |
| 250 | 1,735 | 700 | 1,882 | 1150 | 1,997 |
| 300 | 1,765 | 750 | 1,893 | 1200 | 1,996 |
| 350 | 1,772 | 800 | 1,941 | | |
| 400 | 1,792 | 850 | 1,949 | | |

Fig. 9. Curva inicial de absorbancia, donde se aprecia claramente los dos segmentos exponencial y estacionario.

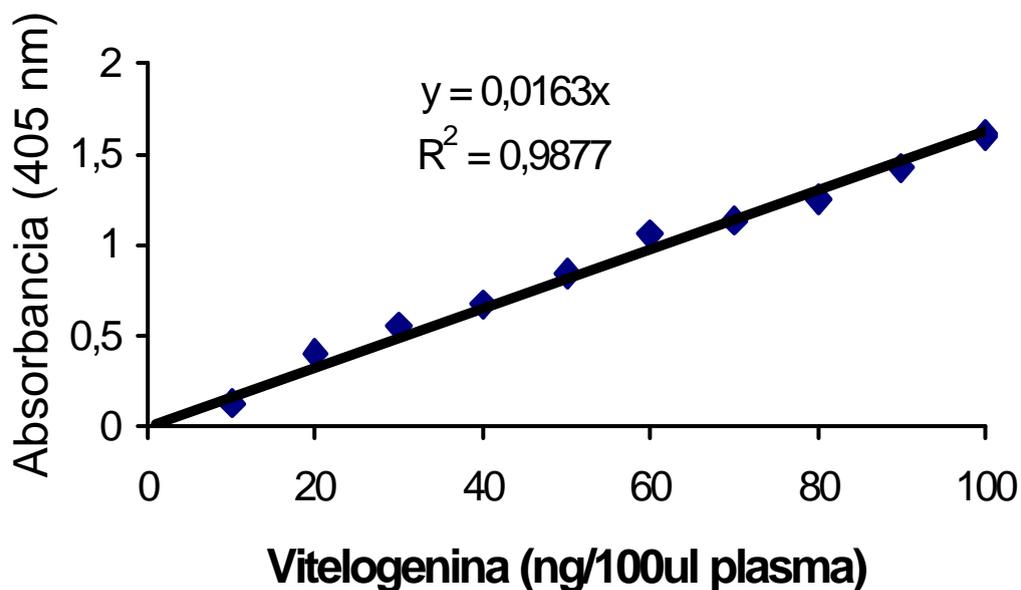


Ya que sólo se utilizará la sección exponencial de la curva la que presenta una proporcionalidad entre las variables, se procedió a realizar una serie de diluciones intermedias de las concentraciones comprendidas dentro de esta sección (tabla 12). Mediante una regresión lineal a los resultados de ésta última serie de diluciones se confeccionó la curva ELISA estándar la cual nos permitió medir la concentración de vtg en las muestras de sueros . (Fig.10)

Tabla 12. Resultado de las diluciones intermedias de la porción exponencial de la curva inicial de absorbancia.

| Vtg. (ng/100 ulsuero) | Abs. (405 nm) | Vtg. (ng/100 ul suero) | Abs. (405 nm) |
|--------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| 10 | 0.126 | 60 | 1.060 |
| 20 | 0.403 | 70 | 1.132 |
| 30 | 0.550 | 80 | 1.251 |
| 40 | 0.672 | 90 | 1.422 |
| 50 | 0.843 | 100 | 1.603 |

Fig.10. Curva ELISA estándar, obtenida de la regresión lineal realizada al segmento exponencial de la curva ELISA. El valor del intercepto fue aproximado a cero para la ecuación.



El coeficiente de regresión presentado por la curva ELISA estándar, fue de 0.98 lo que ratifica una relación directamente proporcional entre la cantidad de vitelogenina y la absorbancia.

Para calcular la concentración de vtg. de los sueros problemas, los valores de las absorbancias obtenidas fueron interpolados en la curva ELISA estándar.

5.3.2 Niveles de Vtg. encontrados en las muestras de sueros de hembras

Los valores de vitelogenina, encontrados mediante la interpolación en la curva de calibración del ELISA, para las muestras de suero correspondientes a los especímenes hembras se resumen en la tabla 13.

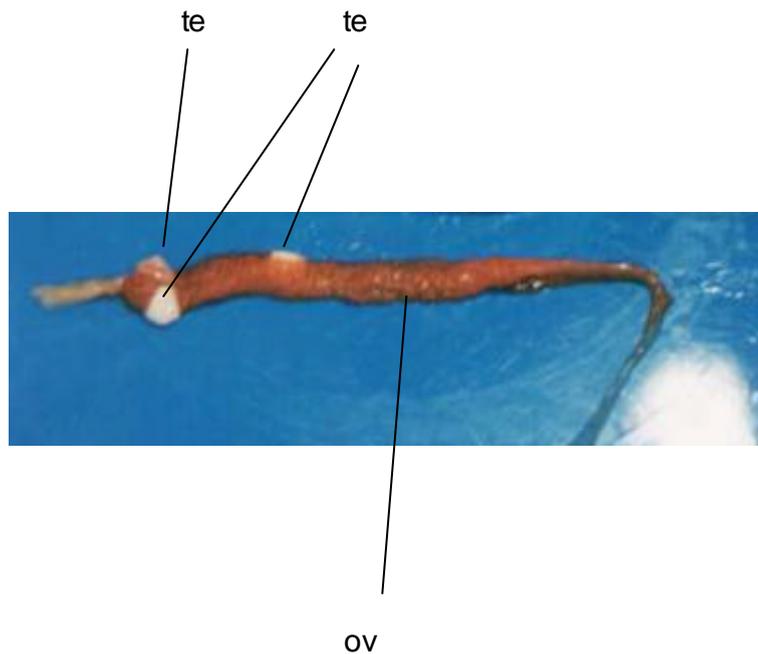
Tabla 13. Resultado del análisis de vitelogenina en especímenes hembras, mediante el test de ELISA. La primera columna presenta el promedio de las absorbancias obtenidas para cada muestra, la segunda muestra la cantidad de vitelogenina encontrada interpolando la absorbancia en la curva ELISA estándar, la tercera columna es la concentración de vitelogenina interpolada multiplicada por el N° de diluciones de la muestra, la penúltima columna muestra la cantidad total de proteínas presente en las muestras y la última columna presenta el porcentaje de vitelogenina que posee la muestra con respecto a la cantidad de proteínas totales.

| Prom. Absorbancias | Vg (ug/100ul) | (ug/100ul) * 500 | Vg. Total (mg/ml) | Proteínas tot. (mg/ml) | % de Vg. |
|--------------------|---------------|------------------|-------------------|------------------------|----------|
| 0,162 | 9,9 | 4969 | 4,97 | 62,7 | 7,93 |
| 0,14 | 8,6 | 4294 | 4,29 | 58,5 | 7,34 |
| 0,098 | 6 | 3006 | 3,01 | 59,6 | 5,04 |
| 0,096 | 5,9 | 2945 | 2,94 | 57,7 | 5,1 |
| 0,092 | 5,6 | 2822 | 2,82 | 57,3 | 4,93 |
| 0,146 | 9 | 4479 | 4,48 | 54,9 | 8,16 |
| 0,159 | 9,8 | 4877 | 4,88 | 60,7 | 8,04 |
| 0,118 | 7,2 | 3620 | 3,62 | 60,4 | 5,99 |
| 0,074 | 4,5 | 2270 | 2,27 | 54,3 | 4,18 |
| 0,247 | 15 | 7577 | 7,58 | 68,6 | 11,0 |
| 0,22 | 13 | 6748 | 6,75 | 72,7 | 9,28 |
| 0,21 | 13 | 6442 | 6,44 | 70,6 | 9,12 |
| 0,18 | 11 | 5521 | 5,52 | 70,1 | 7,88 |
| 0,264 | 16 | 8098 | 8,1 | 74,1 | 10,9 |
| 0,236 | 14 | 7239 | 7,24 | 71,5 | 10,1 |
| 0,11 | 6,7 | 3374 | 3,37 | 61,1 | 5,52 |
| 0,098 | 6 | 3006 | 3,01 | 56,2 | 5,72 |
| 0,414 | 25 | 12699 | 12,7 | 63,7 | 19,9 |
| 0,063 | 3,9 | 1933 | 1,93 | 50,9 | 3,8 |
| 0,07 | 4,3 | 2147 | 2,15 | 56,9 | 3,77 |

Con respecto a las muestras de machos normales y neomachos, no se encontraron niveles detectables de vitelogenina por medio de éste método, excepto una muestra

correspondiente a un ejemplar perteneciente a la empresa NISA, el que presentaba un ovario bien conformado con ovas, mientras que el otro ovario se presentaba reducido, con ovas pequeñas y en cuyo extremo superior presentaba pequeños esbozos de tejido testicular incrustados, por lo que se le dio el carácter de neomacho (Fig.11). Éste ejemplar dio una absorbancia de 0.01 lo que nos da una cantidad de 0.31 mg/ml de vitelogenina.

Fig. 11. Ovario reducido con porciones de tejido testicular incrustados en la porción anterior. Ovario (ov), testículo (te)



5.4. Resultados de la Electroforesis de geles de poliacrilamida - SDS al 10% del plasma seminal de macho y sobrenadantes de semen de neomachos

Los resultados preliminares obtenidos, muestran la existencia de diferencias entre las corridas electroforéticas del plasma seminal de macho y las que corresponden a las de sobrenadantes de semen de neomachos, como puede observarse en la figura 12

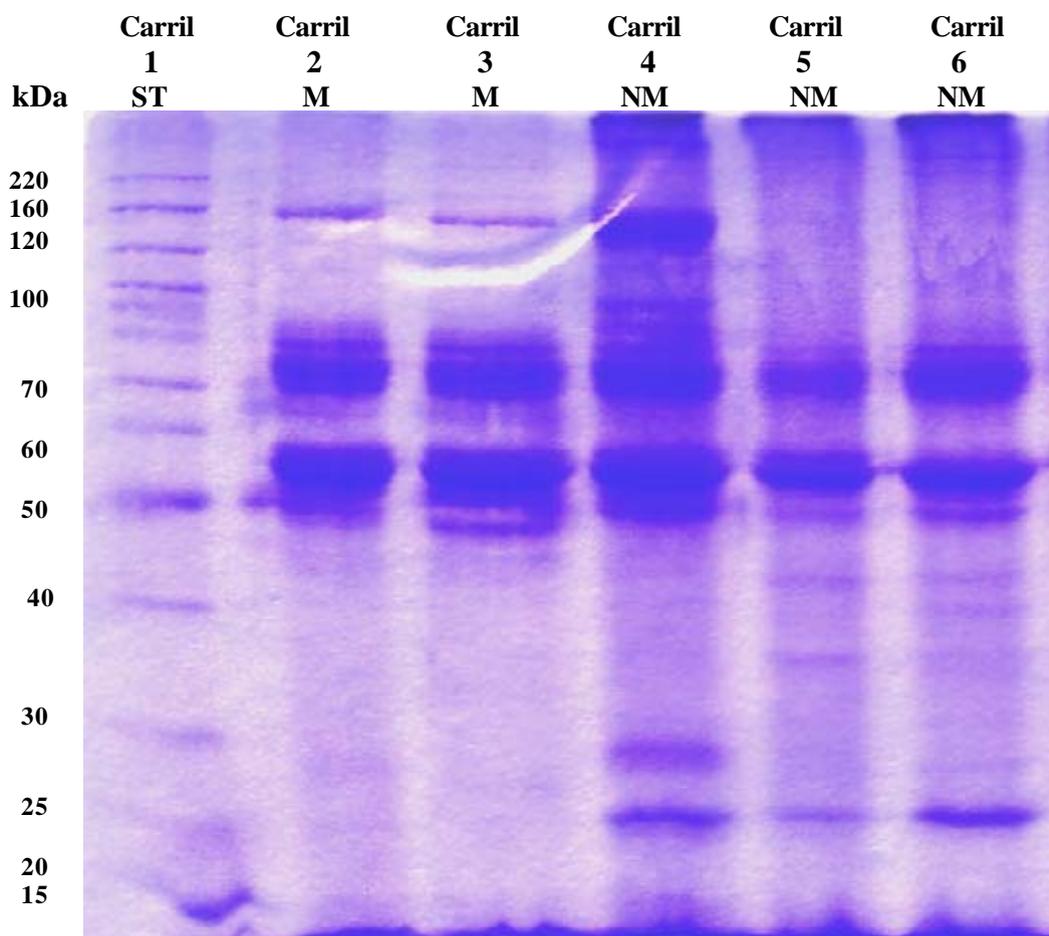


Fig. 12. Corridas electroforéticas en gel de poliacrilamida-SDS de plasma seminal de macho (carriles 2 y 3), sobrenadante de "semen de neomacho" centrifugado (carriles 4, 5 y 6) de Trucha arcoiris (*O. mykiss*) y estándar de proteínas (carril 1) de peso molecular expresada en kDa.

Se puede apreciar en las corridas electroforéticas de los sobrenadantes de semen de neomachos (carriles 4, 5 y 6), una nítida banda que representa una proteína de alto peso molecular (por sobre los 220 Kda.) y una banda de mediana intensidad de peso molecular de 25 Kda. Las cuales no se presentan en las corridas electroforéticas de plasma seminal de machos (carriles 2 y 3), mientras que éstos últimos presentan una banda característica de alto peso molecular aproximadamente de 160 Kda.

Los patrones electroforéticos de ambos grupos de peces muestran dos nítidas bandas en común una de 55 Kda. y la otra de 75 Kda.

El análisis de los patrones electroforéticos en individuos de una misma condición sexual, muestra que existen diferencias individuales, por ejemplo entre las corridas de los machos se aprecian diferentes bandeos de diversa intensidad y peso molecular, así podemos observar que el carril 2 presenta dos bandas de baja intensidad de 25 y 28 Kda. mientras que el carril 3 muestra una banda de muy baja intensidad y de alto peso molecular (220 Kda.), a demás de una banda de mayor intensidad con 48 Kda. de peso molecular.

Entre las corridas de los sobrenadantes de semen de neomachos, fue donde se presentaron mayor cantidad de diferencias entre sus patrones electroforéticos, por ejemplo, en el carril 4 se destacan unas bandas de 120, 90,80 y 30 Kda. respectivamente. Mientras que en el carril 5 se observan 2 bandas de 37 y 45 Kda. y en el sexto carril se aprecian 5 bandas de bajísima nitidez que van de los 30 a los 45 Kda. de peso molecular.

6. DISCUSIÓN

En el cultivo de truchas en nuestro país, la producción de peces neomachos ha llegado a ser fundamental, ya que es la herramienta biotecnológica de elección, que permite generar poblaciones monosexo hembra y eliminar con éxito el gran problema de la maduración precoz en los machos, además, esta forma de producir poblaciones todo hembra no es rechazada por el mercado internacional.

Estas ventajas han generado un mayor interés en la investigación de la biología de los neomachos, la cual se ha concentrado fundamentalmente en la obtención de neomachos (Johnstone et al., 1978; Goetz et al., 1979; Solar et al.,1984; Piferrer y Donaldson, 1989), y en estudios histológicos del desarrollo y estructura gonadal (Piferrer y Donaldson,1989; Delgado, 1999; Cárcamo, 2001).

Nuestro interés está enfocado en desarrollar un método que permita la identificación inequívoca de un individuo neomacho, mediante exámenes serológicos que permitan detectar alguna característica discriminatoria, ya sea en sus proteínas totales o bien la detección de alguna proteína que les sea característica. El examen microscópico propuesto por Delgado (1999) implica el sacrificio del pez, un análisis serológico o de plasma seminal, solo implica una toma de muestra evitando el sacrificio.

El método usado para la determinación de las proteínas totales, basado en ácido bicinconínico mostró ser muy conveniente por su sencillez y rapidez, ratificando lo descrito por Villanueva (1999).

Los resultados obtenidos del análisis de las concentraciones de proteínas totales con las pruebas estadísticas, mostraron que no existen diferencias significativas entre los machos normales con las agrupaciones de neomachos, tanto en sus varianzas como en los valores de media que presentaron (tablas 9 y 10), por tanto, no se puede discriminar entre machos y neomachos por este método.

Aunque existen diferencias significativas en los valores de varianza y de media entre el grupo de las hembras y el grupo de peces inmaduros, esto no permite discriminar hembras e individuos inmaduros, debido a que algunos valores individuales, entre

ambos grupos de peces se sobreponen. Lo mismo se aprecia entre los peces inmaduros y los neomachos con testículos globulares o lobulados con ambos conductos espermáticos cerrados, donde también se observa diferencia significativa de varianza y de media.

Las hembras maduras presentaron diferencias significativas solo en el valor de la media con todos los grupos de neomachos, esta sola diferencia no permite discriminar individualmente entre hembras maduras y neomacho.

Con respecto al valor de proteínas totales presentado por el grupo de las hembras, se puede apreciar que es menor comparado con valores presentados por Villanueva, 2000, para hembras de salmón coho (*O. kisutch*), los cuales varían de 54 mg/ml. hasta 140 mg/ml. esto se debería a diferencias normales entre las especies.

Los resultados obtenidos en la construcción de la curva ELISA estándar, muestran una relación directamente proporcional entre la absorbancia de las muestras a 405 nm. y la cantidad de vitelogenina presente en ellas, lo que se reflejó con el valor del coeficiente de correlación obtenido (0.9877). La ecuación de la recta resultante de la regresión lineal fue: $y = 0.0163X$ (Fig. 10). Estos valores son muy similares a los obtenidos por Villanueva, 2000.

Con respecto a los resultados obtenidos por el test de ELISA para el estudio de la concentración de vitelogenina en el suero de hembras, machos y neomacho, se observó que todas las muestras de hembras presentaban vitelogenina con valores variables, con un promedio de 4.68 mg/ml.

No se encontró vitelogenina en machos, lo que es esperado ya que es una proteína netamente femenina.

En neomachos tampoco se encontró niveles detectables de vitelogenina, excepto en una muestra la que mostró 0.31 mg/ml. de vtg, lo cual está relacionado con una reversión sexual parcial del pez, ya que al examen visual se observó que presentaba el desarrollo de un ovario normal y el otro estaba atrofiado con pequeñas porciones de tejido testicular incrustados (Fig.11).

Los neomachos con testículos funcionales, que son aquellos de interés para las empresas, son peces que han tenido una buena absorción de la hormona 17- α metiltestosterona y que generalmente no presentan conductos espermáticos (Fig.2 y 3), o bien presentan conductos atrofiados con y sin salida (Fig.4 y 5), no presentan niveles detectables de vitelogenina, aunque presenten vacuolas vitelinas como lo reportado Cárcamo (2001). Por lo tanto se rechaza la hipótesis propuesta.

Pese a que las muestras de vitelogenina plasmática de trucha arcoiris, tienen reacción cruzada con el anticuerpo anti-vitelo de coho, no tenemos certeza que idénticas absorbancias correspondan a idénticas concentraciones de vtg de trucha, ya que la curva de calibración se obtuvo con diluciones de vtg de coho, en base a los reportes realizados por Leal (1996) y Villanueva (1999). Por tanto el test ELISA nos permitió solo una cuantificación comparativa de la vitelogenina presente en los diferentes sueros de truchas machos, neomachos y hembras analizados.

Cabe señalar que a pesar de lo sugerido en el párrafo anterior, la concentración de vtg representa en promedio más del 8% del contenido total de proteínas totales, valores similares a los descritos por Villanueva, (1999).

Las corridas electroforéticas (Fig.12), de los sobrenadantes de semen de neomachos (carriles 4,5 y 6) muestran una nítida banda que representa una proteína de alto peso molecular (por sobre los 220 Kda.) y una banda de mediana intensidad, de peso molecular de 25 Kda. , las cuales no se presentan en las corridas electroforéticas de plasma seminal de machos (carriles 2 y 3), mientras que éstos últimos presentan una banda que podría ser característica, de alto peso molecular aproximadamente de 160 Kda.

Entre las muestras de ambos grupos de peces, la electroforesis muestra dos nítidas bandas en común una de 55 Kda. y la otra de 75 Kda.

El análisis de los patrones electroforéticos en individuos de una misma condición sexual, muestra que existen diferencias individuales, siendo el semen de los neomachos el que presentó mayor cantidad de diferencias entre sus patrones electroforéticos. Las diferencias entre los patrones electroforéticos de las muestras

pertenecientes a un mismo grupo, ya sea aquel de machos normales o de neomachos, se debería a los factores individuales del semen de cada espécimen, que afectarían la calidad de los espermatozoides (Stoss y Holtz, 1983)(Séller et al., 1996).

La gran cantidad de bandas que presentan las corridas electroforéticas de los neomachos, se deberían a que éstos presentan una mayor concentración de espermatozoides con una mayor diversidad y concentración de proteínas, lo que también señala Ciereszko y col. (1996), al sugerir que existe una correlación significativa entre la concentración proteica del plasma seminal y la cantidad de espermatozoides. De éste estudio preliminar, se desprende que el análisis electroforético del plasma seminal, es la línea a seguir en futuros estudios cuyo propósito sea la identificación de neomachos.

7. CONCLUSIONES.

- No se encontró diferencias significativas en la cantidad de proteínas totales entre especímenes machos normales y los neomachos.
- Se encontró diferencia significativa entre el promedio de proteínas totales de hembras normales, respecto de los grupos de neomachos, no así en la varianza.
- No se puede reconocer a un individuo neomacho por medio del análisis de la presencia de la vitelogenina, ya que éstos no presentan niveles detectables.
- Resultados preliminares indican que posiblemente existen diferencias en los perfiles electroforéticos de plasma seminal de machos y el sobrenadante de semen de neomachos, lo que podría representar un verdadero avance en la identificación de los ejemplares neomachos.

8. BIBLIOGRAFIA

- Cárcamo, R., 2001.** Análisis de la ultraestructura de gónadas y espermatozoides de hembras masculinizadas con andrógenos de trucha arcoiris ***Oncorhynchus mykiss*** (Smith y Stearly, 1989). Tesis de grado para Licenciado en Biología Marina. Universidad Austral de Chile.
- Carnevali, O. and Belvedere, P., 1991.** Comparative studies of fish, amphibian, and reptilian vitellogenin. *J. Experiment. Zool.*, 259: 18-25.
- Cirieszko, A., Liu, K., 1996.** Effects of season dietary treatment on some biochemical characteristics of rainbow trout (***Oncorhynchus mykiss***) semen. *Fish Physiology and Biochemistry*. 15: 1-10
- Delgado, M., 1999.** Desarrollo gonadal de hembras masculinizadas con andrógenos en trucha arcoiris, ***Oncorhynchus mykiss*** (Smith y Stearly, 1989). Tesis de grado para Licenciado en Biología Marina. Universidad Austral de Chile.
- Donaldson, E.M. & Hunter, G.A., 1982.** Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 99-110.
- Goetz, F.W., Donaldson, E.M., Hunter G.A. & Dye, H.M., 1979.** Effects of estradiol-17 beta and 17 alpha-methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, ***Oncorhynchus kisutch***. *Aquaculture*, 17: 267-278.
- Gordon, M., Owen, T., Ternan, T. and Hildebran, L., 1984.** Measurement of a sex specific protein in skin mucus of premature coho salmon (***Oncorhynchus kisutch***). *Aquaculture*, 43: 333-339.
- Gordon, M., Klotins, K.C., Campbell, V.M. and Cooper, M.M., 1987.** Farmed salmon bloodstocks management, *B:C: Research, Vanuver*. 220 pp.
- Gutiérrez, P., 1998.** Método inmunológico de aplicación masiva para conocer el sexo en trucha arcoiris (***Oncorhynchus mykiss***) (Smith y Stearly, 1989). Tesis Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso. 65 pp.
- Hara, A., Tacaño, K. And Hirai, H., 1983.** Immunochemical identification of female specific serum protein, vitellogenin, in the medaks, (***Oryzias latipes***). *Comp. Biochem. Physiol.* 76A: 135-141.
- Hunter, G.A., Solar, Y.I., Baker, Y.J & Donaldson, E.M., 1986.** Feminisation of coho salmon (***Oncorhynchus kisutch***) and chinook (***Oncorhynchus tshawytscha***) by immersion of alevins in a solution of estradiol-17beta. *Aquaculture*, 53: 295-302.
- Hurk R Van Den & Slob G.A. (1981).** A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout. *Cell Tis Res.* 218: 487-497

- Idler, D. R., Hwang, S.J. and Crim, L.W., 1979.** Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) plasma by radioimmunoassay. *J. Fish. Res. Board. Can*, 36: 574-578.
- Jalabert, B., Billard, R. & Chevassus, B., 1975.** Preliminary experiments on sex control in trout: production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 15: 19-28.
- Jonhstone, R.S., Simpson, T.H. & Youngson, A.F., 1978.** Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture* 13: 115-134.
- Jonhstone, R., Simpson, T.H., Youngson A.F. & Whitehead, C. 1979.** Sex reversal in salmonid culture . Part II. The progeny of sex reversed rainbow trout. *Aquaculture*, 18: 13-19.
- Jonhstone, R. & Youngson, A.F., 1984.** The progeny of sex-inverted female Atlantic salmon (*Salmo salar L*). *Aquaculture* , 37:1779-182.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Leal, M.A., 1996.** Método inmunológico de aplicación masiva para reconocer el sexo de salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*). Tesis Esc. de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 63 pp.
- Le Bail, P.Y. and Breton, B., 1981.** Rapid determination of the sex of puberal salmon fish by a technique of immunoagglutination. *Aquaculture*, 22: 367-375.
- Maitre, J.L., Le Guellec, C., Derrien, S., Tenniswood, M. and Valotaire, Y., 1985.** Measurements of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis: application to the kinetic analysis of estrogens stimulation in the male. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 63: 982-987.
- Nitrigual, M.A., 1996.** Base inmunológica para el sexage de individuos prepuberres de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). Tesis Esc. de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 40 pp.
- Norberg, B. and 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*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 869-876.
- Okada, H., 1973.** Studies on sex differentiation of salmonidae. Y. Effects of estrone on sex differentiation of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii irideus* Gibbons). *SCI. Rep. Hokkaido Fish Hatch.* 28: 11-21.

- Piferrer, F. & Donaldson, E.M., 1989.** Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*, 77: 251-262.
- Purdom, C.E., Thompson, D. & Lou, Y. D. 1985.** Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, by the suppression of meiotic and mitotic metaphase. *J. Fish Biol*, 27: 73-79.
- Redshaw, M.R. and Follett, B.K., 1971.** The crystalline yolk platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian. *Biochem. J.*, 124: 759-766.
- Simpson, T.H., Johnstone, R. & Youngson, A.F. 1979.** Female stocks less vulnerable. *Fish farmer*2 (3): 20-21.
- Solar, Y.Y., Donaldson, E.M. & Hunter, G. 1984.** Optimisation of treatment regimens for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17 alpha-metilttestosterone . *Aquaculture*, 42: 129-139.
- Stifani, S., Le Menn, F., Rodríguez, J.M. and Schneider, W.J., 1990.** Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1045: 271-279.
- Stoss, J., W. Holts. 1983b.** Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival: sucrose and KCL as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32: 321-330.
- Tsumura, K., V.E. Blann, C.A. Lamont., 1991.** Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. *Fish Culturist*. 53 (1), 45-47.
- Vidal, L., 2002.** Estadística de exportación de salmonídeos. *Aquanoticias* 72: 80-81.
- Villanueva, E. N. 1999.** Desarrollo de un método inmunocolorimétrico para la cuantificación de vitelogenina circulante en el salmón del pacífico *Oncorhynchus kisutch*. Tesis de grado para Licenciado en Biología Marina. Universidad Austral de Chile.
- Zanuy, M. y Carrillo, P., 1987.** Reproducción de los teleósteos y su aplicación en la acuicultura 1: 1-102. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid.