

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 013**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/74** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2011 PCT/US2011/062032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12074870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2011 E 11845423 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2646833**

54 Título: **Determinación de las características sexuales de peces usando hormonas peptídicas**

30 Prioridad:

**29.11.2010 US 417803 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.05.2018**

73 Titular/es:

**MOTE MARINE LABORATORY, INC. (100.0%)  
1600 Ken Thompson Parkway  
Sarasota, FL 34236, US**

72 Inventor/es:

**WETZEL, DANA L.;  
REYNOLDS, JOHN E. y  
ROUDEBUSH, WILLIAM E.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 667 013 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Determinación de las características sexuales de peces usando hormonas peptídicas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para determinar el sexo de los peces, la disponibilidad para la reproducción, o disponibilidad para la recolección de huevas.

10 **Antecedentes**

Para ciertos peces comercialmente importantes tal como el esturión (familia Acipenseridae), los peces hembra adultos tienen un enorme valor por sus huevas o caviar. La carne del pez macho solo tiene valor económico limitado, y el coste de criar machos hasta la madurez puede superar con creces el valor de su carne.

15 Las varias especies de esturión alcanzan la madurez sexual a edades algo diferentes, y dentro de cada especie se puede alcanzar la madurez sexual a edades diferentes basado en factores que incluyen la disponibilidad de alimento y el estado nutricional. Los peces criados en cautividad pueden estar mejor alimentados y crecer más rápido que sus equivalentes silvestres, y pueden alcanzar la madurez sexual más temprano que en la naturaleza. Científicos en el Parque de Acuicultura del Laboratorio Mote Marine (MAP), una instalación de acuicultura de interior, han encontrado que esturiones siberianos machos y hembras criados en cautividad alcanzan la madurez sexual a aproximadamente cinco años de edad, punto en el que las huevas se pueden recolectar del pez hembra. La recolección implica abrir el pez, punto en que la inspección visual puede distinguir el sexo. Esta técnica de determinación del sexo, sin embargo, es letal para el pez e implica criarlos hasta que alcanzan la madurez.

25 En empresas de acuicultura, sería extremadamente útil determinar el sexo de esturiones macho y hembra muy jóvenes (por ejemplo, a la edad de tres o más joven) de una manera no letal. Hacerlo así permitiría a los criadores de esturiones eliminar los machos jóvenes y evitar de esta manera los costes asociados con varios años adicionales de criar peces machos menos valiosos, enfocar los recursos en el cuidado y crianza de peces hembra muy valiosos, y optimizar el uso de espacio de tanque disponible. Los métodos no letales para la determinación temprana del sexo de los peces incluyen los descritos en Vecsei et al., "A noninvasive technique for determining sex of live adult North American sturgeons", *Environmental Biology of Fishes* **68**: 333-338 (2003); Rainer, "Genetic sex determination in sturgeons: practical application in caviar production", *IST World* (2003); Henderson-Arzapalo et al., "Determination of sex by molecular genetic methods in Atlantic sturgeon", USGS Study Plan Number 02085 (2004); Colombo et al., "Use of Ultrasound Imaging to Determine Sex of Shovelnose Sturgeon", *North American Journal of Fisheries Management* **24**:322-326 (2004), Craig, "Successful stepping stones to sex identification of lake sturgeon by blood plasma hormones", Preliminary Proceedings of the 2008 Great Lakes Lake Sturgeon Coordination Meeting (2008); Craig et al., "Sex assignment of lake sturgeon (*Acipenser fluvescens*) based on plasma sex hormone and vitellogenin levels", *Journal of Applied Ichthyology Special Issue: Proceedings of the Inaugural Meeting of the North American Chapter of the World Esturión Conservation Society, Ottawa, Canadá, 19-21 de agosto, 2008*, **25**, Número Suplemento s2, pp. 60-67 (Octubre, 2009); y Keyvanshokoo et al., "A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon", *Aquaculture Research*, **41**, Número 9, pp. e1-e7 (Agosto, 2010). Sin embargo, los métodos existentes de determinación de sexo en general carecen de suficiente precisión o facilidad de uso, especialmente en peces jóvenes.

45 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona un método para determinar el sexo de los peces, disponibilidad para la reproducción, o disponibilidad para la recolección de huevas, método que comprende recoger sangre de pez; 50 opcionalmente separar el suero o plasma de tal sangre; medir la concentración en tal suero, plasma o sangre de una o más hormonas peptídicas de la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta (superfamilia TGF- $\beta$ ); y determinar el sexo del pez, disponibilidad para la reproducción, o disponibilidad para la recolección de huevas basado en la concentración de tales hormonas peptídicas.

55 En una forma de realización del método inventivo, los peces son esturiones.

En otra forma de realización de las formas de realización anteriores, los peces están criados por acuicultura y tienen tres años de edad o menos.

60 En otra forma de realización de las formas de realización anteriores, la hormona peptídica comprende inhibina A, o la hormona peptídica comprende inhibina B o AMH.

En otra forma de realización de las formas de realización anteriores, la concentración de la hormona peptídica se mide en suero o plasma.

65

En otra forma de realización de las formas de realización anteriores, los peces de muestra, o peces de muestra seleccionados que tienen un sexo deseado, se devuelven de forma no letal al agua sin asfixia.

La presente invención también proporciona un método que comprende:

- 5
- (a) el método anterior para determinar el sexo del pez; y además
  - (b) sacrificar los peces macho, criar los peces hembra restantes hasta la madurez y recolectar huevos de los peces hembra restantes maduros.

10 En el presente documento también se describe un método para la determinación de las características sexuales de los peces, método que comprende recoger sangre del pez; opcionalmente separar el suero o plasma de tal sangre; medir la concentración en tal suero, plasma o sangre de una o más hormonas peptídicas de la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta (superfamilia TGF- $\beta$ ); y determinar una característica sexual deseada del pez basada en la concentración de tal hormona peptídica. Las características sexuales de peces ejemplares que se pueden determinar usando el método divulgado incluyen sexo del pez, disponibilidad para la reproducción, disponibilidad para la recolección de huevos y evaluación de factores medioambientales u otros que influyen en el desarrollo sexual, selección sexual o hermafroditismo. El método divulgado se puede, por ejemplo, usar para determinar el sexo y distinguir entre peces machos y hembras con alta precisión en estadios muy tempranos, por ejemplo, tan poco como 12 meses y posiblemente incluso más jóvenes para esturión siberiano. El método divulgado se ha usado para identificar correctamente el sexo en peces para los que el análisis de ultrasonidos dio determinación de sexo imprecisa.

25 En el presente documento también se divulga un kit de prueba de campo para la determinación de las características sexuales de peces, que comprende un dispositivo manual que tiene una pluralidad de sitios de prueba que pueden aceptar una muestra de sangre, suero o plasma de un pez e indica la concentración de una hormona peptídica, cada sitio de prueba comprende un soporte que lleva un anticuerpo de captura de acción rápida y un anticuerpo indicador de acción rápida u otro indicador que proporciona una indicación colorimétrica u otra de tal concentración de hormona peptídica en menos de 15 minutos después de la exposición del soporte a tal muestra.

30 En el presente documento también se divulga un kit de prueba de campo para para la determinación de las características sexuales de peces, que comprende un soporte que lleva un anticuerpo de captura de acción rápida y un anticuerpo indicador de acción rápida u otro indicador que proporciona una indicación colorimétrica u otra de la concentración de hormona peptídica en menos de tres minutos después de la exposición del soporte a una muestra de sangre, suero o plasma de un pez, y con una precisión del 90% o mayor cuando se compara con datos determinados histológicamente.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La **figura 1**, **figura 2** y **figura 3** son gráficos que ilustran las concentraciones de inhibina A en recogidas de esturiones siberianos de 16 meses, 32 meses y 39 meses de edad;

La **figura 4** y la **figura 5** son gráficos que ilustran las concentraciones de inhibina B en recogidas de esturiones siberianos de 3 años y 5 años de edad.

45 La **figura 6** es un gráfico que ilustra las concentraciones de inhibina B y maduración de huevos en una recogida de esturión siberiano de 5 años de edad;

La **figura 7** es un gráfico que ilustra las concentraciones de inhibina B en una recogida de pámpano de Florida maduro e inmaduro; y

50 La **figura 8** es un gráfico que ilustra las concentraciones de AMH en una recogida de pámpano de Florida maduro e inmaduro.

La **figura 9** es un kit de prueba de campo que determina las características sexuales de peces.

55 **Descripción detallada**

La presente invención proporciona un método para determinar el sexo de peces, disponibilidad para la reproducción, o disponibilidad para la recolección de huevos, según las reivindicaciones 1 a 11, y un método que comprende (a) el método para determinar el sexo de peces según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y además (b) sacrificar peces macho, criar los peces hembra restantes hasta la madurez y recolectar huevos de los peces hembra restantes maduros.

65 El método divulgado y el kit de prueba de campo se pueden usar para determinar las características sexuales de los peces de una variedad de los llamados "peces óseos" (clase Osteichthyes) de dos subclases, Chondrostei y Teleostei, incluyendo especies que se pueden criar en sistemas de acuicultura. Los peces de la subclase

Chondrostei (que tienen principalmente esqueletos cartilagosos, con alguna osificación) pueden ser, por ejemplo, de la familia Acipenseridae, incluyendo especies de peces del género *Acipenser* tal como esturión del Adriático (*Acipenser naccarii*), esturión del Amur (*Acipenser schrenckii*), esturión del Atlántico (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*), esturión del Baikal (*Acipenser baerii baicalensis*), esturión del Báltico o europeo (*Acipenser sturio*), esturión chino (*Acipenser sinensis*), esturión barba de flecos (*Acipenser nudiventris*), esturión verde (*Acipenser medirostris*), esturión del golfo (*Acipenser oxyrinchus desotoi*), esturión japonés (*Acipenser multiscutatus*), esturión de lago (*Acipenser fidvescens*), esturión persa (*Acipenser persicus*), esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*), esturión de Sajalín (*Acipenser mikadoi*), esturión chato (*Acipenser brevirostrum*), esturión siberiano (*Acipenser baerii baerii*), esturión estrellado (*Acipenser stellatus*), esturión esterlete (*Acipenser ruthenus*), esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) esturión del Yangtsé (*Acipenser dabryanus*); especies de peces del género *Huso* tal como esturión beluga (*Huso huso*) y esturión Kaluga (*Huso dauricus*); especies de peces del género *Scaphirhynchus* tal como esturión de Alabama (*Scaphirhynchus suttkusi*), esturión pálido (*Scaphirhynchus albus*) esturión pala (*Scaphirhynchus platyrhynchus*); y especies de peces del género *Pseudoscaphirhynchus* tal como esturión de Amu Darya (*Pseudoscaphirhynchus kaufmanni*), esturión enano (*Pseudoscaphirhynchus hermanni*) y esturión de Syr Darya (*Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi*). Otras especies de peces (que representan el suborden Teleostei, que tienen esqueletos completamente óseos) cuyas características sexuales se pueden determinar usando el método divulgado incluyen siluro (orden *Siluriformes*), pámpano de Florida (*Trachinotus carolinus*), mero (subfamilia Epinephelinae), gallineta (género *Sebastes*), salmón (familia Salmonidae), lubina (varias especies), pargo (varias especies incluyendo esas en el género *Lutjanus*) y róbalo (varias especies incluyendo esas en la familia Centropomidae). El método divulgado se puede usar en peces vivos o muertos incluyendo peces silvestres o criados domésticamente, y se puede usar para una variedad de fines incluyendo investigación (por ejemplo, estudios de historia de la vida de peces silvestres), conservación, aprovisionamiento, consumo y acuicultura. El método divulgado tiene valor particular para determinar el sexo de peces vivos inmaduros, por ejemplo, peces criados en acuicultura de cuya población femenina finalmente se recolectarán huevas.

El método divulgado y el kit de prueba de campo se pueden usar para determinar la disponibilidad de un pez individual para la reproducción. Por ejemplo, los pámpanos de Florida hembra no están todos listos para la reproducción a la misma edad. El método divulgado permite la selección de peces que lo más probablemente se reproduzcan en un tiempo determinado o la selección de un tiempo apropiado para cruzar peces individuales.

El método divulgado y el kit de prueba de campo se pueden usar para evaluar la madurez de los huevos de modo que permita la recolección de huevas en un estadio de madurez apropiado. Si las huevas de recolectan demasiado pronto o demasiado tarde, sus características de sabor pueden ser menos que óptimas. Además, las huevas sin tocar finalmente se resorben por el pez y esto reduce los rendimientos obtenibles.

El método divulgado y el kit de prueba de campo se pueden usar para evaluar la influencia de factores medioambientales u otros que afectan al desarrollo sexual, selección sexual o hermafroditismo. Esto tiene un valor particular en investigación en peces tanto en poblaciones de peces silvestres como de acuicultura.

Se puede medir una variedad de concentraciones de hormonas peptídicas de la superfamilia TGF- $\beta$  usando el método divulgado. Tales hormonas peptídicas ejemplares incluyen, hormona anti-mülleriana (AMH); proteínas morfogenéticas óseas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8A, 8B, 10 o 15 (BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP9A, BMP10 o BMP15); factores de diferenciación de crecimiento 1, 2, 3, 3A, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 (GDF1, GDF2, GDF3, GDF3A, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDF10 y GDF11); factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF); inhibina A (INHA); inhibina B (INH B); inhibina beta A, beta B, beta C o beta E (INHBA, INHBB, INHBC o INHBE); factores de determinación izquierda derecha 1 o 2 (LEFTY1 o LEFTY2); Nodal; factores de crecimiento transformantes beta 1, beta 2 o beta 3 (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 o TGF- $\beta$ 3); y combinaciones de cualesquiera dos o más de tales hormonas peptídicas. Medir las concentraciones de dos o más hormonas peptídicas puede proporcionar precisión mejorada en peces jóvenes y particularmente en peces muy jóvenes. Las medidas de la concentración de una, dos cualquiera o todas de AMH, inhibina A e inhibina B se prefieren, ya que son medidas de o que implican la concentración de inhibina A. Las medias se pueden, por ejemplo, realizar usando una variedad de técnicas comercial o experimentalmente disponibles, siendo las pruebas de inmunoensayo enzimático (EIA) preferidas y siendo las pruebas de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) especialmente preferidas. Kits de pruebas de EIA y ELISA para ensayar en seres humanos y otros mamíferos están comercialmente disponibles de un número de suministradores incluyendo Beckman Coulter (por ejemplo, el ACCESS™ Inhibin A Reagent Pack, no. de cat. A36097), Cell Signaling Technology, Diagnostic Systems Laboratories (por ejemplo, el kit de ELISA de Inhibina A, no. de cat. DSL-10-28100-1), Enzo Life Sciences, Millipore Corp., Raybiotech, Inc., R&D Systems, Serotec Ltd. (por ejemplo, el kit de ensayo de dímero de inhibina A ultrasensible, no. de cat. MCA950KZZ), Sigma-Aldrich Co. y USCN Life Science Inc. Los protocolos y procedimientos especificados por el fabricante para ensayo en seres humanos se pueden usar en muchos casos sin modificación significativa para ensayos en peces, incluyendo el uso de estándares y controles apropiados. Por ejemplo, se pueden recoger aproximadamente 1-2 ml de sangre completa de la vena caudal de un pez y analizar por ELISA. Para peces vivos la muestra de sangre se obtiene deseablemente usando un método de muestreo mínimamente invasivo no letal. Preferiblemente, se separa suficiente suero o plasma de la muestra de sangre completa (por ejemplo, usando centrifugación o filtración) para proporcionar aproximadamente 0,5 ml de suero o plasma de cada pez. El suero, plasma o sangre completa se puede, si se desea, almacenar (por ejemplo, en un frigorífico) o congelar (por ejemplo, en un congelador) antes del análisis, y

calentar o descongelar si se necesita cuando el análisis se realiza posteriormente. Mientras tanto, los peces vivos se pueden marcar usando cualquier técnica adecuada, almacenar (por ejemplo, en un tanque, estanque u otra instalación de almacenamiento acuosa adecuada), y posteriormente (por ejemplo, uno o más días después) recuperar para procesamiento adicional después de que se hayan obtenido las medidas de concentración deseadas.

5 La sangre, suero o plasma recogidos se pueden colocar en los pocillos de placas de microtitulación recubiertos con anticuerpos apropiados (por ejemplo, anticuerpos dirigidos hacia AMH, inhibina A, inhibina B u otros miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ ). Después de etapas de incubación y lavado, se puede añadir un anticuerpo de detección (por ejemplo, un anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano) a los pocillos seguido por un sustrato (por ejemplo, tetrametilbencidina). Se pueden medir los cambios colorimétricos a las longitudes de onda apropiadas usando un lector de microplacas, siendo la absorbancia medida directamente proporcional a la concentración de la hormona peptídica en la muestra. Se pueden generar curvas estándar y usar para determinar la concentración de la hormona peptídica en cada muestra. Los resultados se pueden usar para clasificar los peces, dependiendo la manera de clasificación en general de la hormona peptídica elegida y la característica sexual del pez deseada. Por ejemplo, en la determinación del sexo de los peces basada en inhibina A o inhibina B, los esturiones machos muestran altas concentraciones de la hormona peptídica medida (por ejemplo, concentraciones por encima de aproximadamente 10, por encima de aproximadamente 15, por encima de aproximadamente 100, por encima de aproximadamente 200 o por encima de aproximadamente 300 picogramos por mililitro o pg/ml dependiendo en parte de la edad del pez) y las hembras de esturiones muestran bajas concentraciones de hormona peptídica medida (por ejemplo, concentraciones por debajo de aproximadamente 300, por debajo de aproximadamente 200, por debajo de aproximadamente 100, por debajo de aproximadamente 15, o por debajo de aproximadamente 10 pg/ml, de nuevo dependiendo en parte de la edad del pez). Para la determinación del sexo del pez en pámpano de Florida basado en inhibina B, los peces macho tienden a mostrar bajas concentraciones de hormona peptídica medida (por ejemplo, concentraciones por debajo de aproximadamente 50 pg/ml) y los peces hembra tienden a mostrar altas concentraciones de hormona peptídica medida (por ejemplo, concentraciones por encima de aproximadamente 50 pg/ml). La determinación del sexo de los peces basada en AMH parece ser menos diferenciadora que la determinación del sexo de los peces basada en inhibina A o inhibina B, pero los peces hembra tienden a mostrar menores concentraciones de hormona peptídica medida que los peces macho. Para medidas de la madurez de las huevas basadas en inhibina B, la concentración de la hormona peptídica tiende a ser mayor en peces con huevas óptimas y menor en peces sin huevas o con huevas resorbidas o demasiado maduras. Un tiempo óptimo para la recolección de huevas puede corresponder, según esto, a peces que tienen aproximadamente 20 pg/ml o más concentración de inhibina B observada.

Preferiblemente, el kit de prueba proporciona una medida de la concentración de hormona peptídica rápida (por ejemplo, inmediata o casi inmediata) de modo que la característica sexual del pez deseada se conocerá poco después de que se tome la muestra de sangre, y sin requerir etapas intermedias muy largas o caras tal como una o más de separación de suero o plasma, congelación de suero o plasma, envío de suero o plasma congelado a un laboratorio lejano, procedimientos de ensayo de química húmeda, etiquetar los peces, devolución de los peces a una instalación de mantenimiento, recuperación de los peces, o emparejamiento de etiquetas con datos de ensayo de laboratorio. Por ejemplo, un kit de ensayo de campo que emplea una tira reactiva u otra superficie indicadora adecuada se puede emplear en o cerca del agua donde residen los peces. Deseablemente, tal kit de prueba de campo se puede usar para evaluar lecturas de concentración de hormonas peptídicas en muestras de sangre entera, suero o plasma justo después de que se hayan sacado u obtenido de otra manera muestras de sangre de los peces. Los kits de prueba actuales comercialmente disponibles típicamente requieren un tiempo apreciable para completar una lectura de concentración. Si un kit de prueba requiere más de 15 minutos para completar una lectura de concentración, entonces en general será necesario marcar, almacenar y recuperar el pez como se ha discutido anteriormente hasta después de que se haya obtenido la lectura de la concentración. Deseablemente el kit de prueba proporciona una lectura adecuadamente fiable (por ejemplo, el 90% o más de precisión cuando se compara con datos determinados histológicamente) en un periodo de tiempo menor (por ejemplo, en menos de 15, 12, 10, 8, 5 o 4 minutos después de la exposición a una muestra de sangre, suero o plasma, y preferiblemente en menos de 3, 2 o 1 minutos después de la exposición). Esto permitirá que un pez en agua se atrape en una red o esté disponible de otra manera para sacar muestras de sangre, se extraiga una muestra de sangre, se obtenga una lectura de concentración usando el kit de prueba y la muestra de sangre, y el pez (o pez que tiene la característica sexual deseada) se devuelva rápidamente al agua sin asfixia una vez se ha determinado la característica sexual deseada.

55 Puesto que las consecuencias de una determinación positiva falsa o negativa falsa serán menos serias de lo que serían en el caso de ensayos en seres humanos, un kit de prueba de campo se puede seleccionar o diseñar con énfasis en velocidad, conveniencia de uso y bajo coste por prueba más que énfasis en precisión o evitar la contaminación cruzada entre muestras, de modo que el ensayo se puede realizar más fácilmente en los periodos de tiempo mencionados anteriormente. Por ejemplo, un kit de prueba de campo puede ser un dispositivo manual que tiene una pluralidad (por ejemplo, al menos 3, 5, 10, 15 o 20) de sitios de prueba que pueden aceptar muestras de sangre, suero o plasma e indicar concentraciones de hormona peptídica. Los sitios de prueba individuales pueden ser móviles o separables con respecto uno u otro o con respecto a resto del dispositivo. Por ejemplo, cada sitio de prueba puede estar en una parte móvil o separable que se puede retirar o mover fuera de sitio después de aceptar una muestra de modo que se pueden ensayar peces adicionales en un sitio de prueba nuevo hasta que el kit entero se haya gastado. Las partes de los sitios de prueba se pueden organizar en filas, por ejemplo, como en una caja de cerillas, de modo que el kit se pueda sujetar en una mano y se pueden usar los dedos en la misma mano

para mover o separar los sitios de prueba usados. El kit de prueba o partes de sitios de prueba pueden, por ejemplo, incluir una película, membrana u otro soporte absorbente o no absorbente que tiene un anticuerpo de captura de acción rápida (por ejemplo, para AMH, inhibina A, inhibina B u otros miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ ) y un anticuerpo indicador de acción rápida u otro indicador que proporciona una indicación colorimétrica u otra de la concentración de hormona peptídica. Para simplificar el uso, la indicación de concentración se puede expresar sencillamente como una predicción de macho o hembra (por ejemplo, usando un símbolo de sexo colorimétrico o identificador alfabético). El kit de prueba puede estar embalado en embalaje no hermético o no estéril para ayudar a reducir el coste por prueba. Por ejemplo, el kit de prueba puede incluir un marco de papel o cartón u otro embalaje que no proporciona una barrera apreciable a la humedad y que se puede hacer sin películas plásticas u hojas metálicas.

La invención se ilustra además en los siguientes ejemplos no limitantes 1 a 6, en los que todas las partes y porcentajes son en peso a menos que se indique de otra manera.

### 15 **Ejemplo 1**

Se tomaron muestras de sangre entera de colecciones de esturiones siberianos criados en el MAP de 16 meses, 32 meses y 39 meses de edad. Las muestras de sangre se centrifugaron y se analizó suero de cada muestra usando kits de prueba de ELISA obtenidos de Beckman Coulter para determinar las concentraciones de inhibina A. Los peces se sacrificaron y el sexo de la mayoría o todos los peces en cada colección se determinó histológicamente. Para los peces de 16 meses de edad, se usó examen histológico para 11 de 23 peces. Para los peces de 32 meses de edad, se usó examen histológico para 14 de 35 peces. Todos los peces de 39 meses de edad se analizaron histológicamente. Se muestran las concentraciones de inhibina A medidas y un código que identifica cada pez y (donde se midió) su sexo histológicamente determinado respectivamente en la figura 1, la figura 2 y la figura 3 para los peces de 16 meses, 32 meses y 39 meses de edad. Para las colecciones de 16 meses y 32 meses de edad, se asumió que la mitad de los peces era de cada sexo y se dibujaron flechas de doble punta que representan los intervalos de inhibina A de hembras y machos predichos en la figura 1 y la figura 2.

Los resultados muestran que esturiones siberianos de 16 meses de edad hembra tenían concentraciones de inhibina A por debajo de aproximadamente 13 pg/ml, y esturiones siberianos de 16 meses de edad macho tenían concentraciones de inhibina A por encima de aproximadamente 13 pg/ml. Los peces más viejos tenían niveles de inhibina A mayores y algo más fácilmente distinguidos, teniendo los esturiones siberianos de 16 meses de edad hembra concentraciones de inhibina A por debajo de aproximadamente 350 pg/ml, y teniendo los esturiones siberianos de 32 meses de edad macho concentraciones de inhibina A por encima de aproximadamente 350 pg/ml. Los esturiones siberianos de 39 meses de edad se identificaron incluso más fácilmente, teniendo las hembras concentraciones de inhibina A por debajo de aproximadamente 50 pg/ml y teniendo los machos concentraciones de inhibina A por encima de aproximadamente 50 pg/ml. Ultrasonido, un método no letal principal para la determinación del sexo de los peces, no proporciona resultados precisos en esturiones jóvenes, y especialmente en esturiones menores de tres años de edad.

### 40 **Ejemplo 2**

Usando el método del ejemplo 1, se midieron las concentraciones de inhibina B en muestras de sangre tomadas de esturiones siberianos de 3 años y 5 años de edad. Se muestran las concentraciones de inhibina B medidas y un código que identifica cada pez y su sexo histológicamente determinado respectivamente en la figura 4 y la figura 5 para peces de 3 años y 5 años de edad. Los resultados en la figura 4 muestran que la mayoría de los peces hembra de 3 años de edad tenían concentraciones de inhibina B por debajo de aproximadamente 15 pg/ml, y la mayoría de los peces macho de 3 años de edad tenían concentraciones de inhibina B por encima de aproximadamente 15 pg/ml. Los resultados en la figura 5 muestran que la mayoría de los peces hembra de 5 años de edad tenían concentraciones de inhibina B por debajo de aproximadamente 50 pg/ml, y la mayoría de los peces macho de 5 años de edad tenían concentraciones de inhibina B por encima de aproximadamente 50 pg/ml.

### 55 **Ejemplo 3**

Usando el método del ejemplo 1, se midieron las concentraciones de inhibina B en muestras de sangre tomadas de esturiones siberianos hembra de 5 años de edad. Los peces también se recolectaron para recoger huevas, y se hizo una evaluación de las características de las huevas (si estaban presentes) y edad de las huevas. Las concentraciones de inhibina B medidas y las observaciones de las huevas se muestran en la figura 6. Los resultados muestran que peces hembra con huevas recolectables deseables tendían a tener concentraciones de inhibina B en o por encima de aproximadamente 20 pg/ml.

### 60 **Ejemplo 4**

Dos esturiones de 5 años de edad maduros se examinaron usando ultrasonido y se evaluó que eran machos. Se tomaron muestras de sangre y se analizaron para la concentración de inhibina A usando el método del ejemplo 1. Las concentraciones de inhibina A resultantes de 25,25 y 38,69 pg/ml se correlacionaban con intervalos esperados

para corresponder con esturiones hembra. Los peces se sacrificaron y sus gónadas se examinaron. Esto confirmó que ambos peces eran realmente hembras y que los resultados obtenidos usando ultrasonido no eran correctos.

**Ejemplo 5**

5 Usando el método del ejemplo 1, se midieron las concentraciones de inhibina B y AMH en muestras de sangre tomadas de pámpanos de Florida machos y hembras maduros e inmaduros. Los resultados para inhibina B y AMH se muestran respectivamente en la figura 7 y la figura 8. Los peces macho tenían concentraciones de inhibina B por debajo de aproximadamente 50 pg/ml y los peces hembra tenían concentraciones de inhibina B por encima de aproximadamente 50 pg/ml. Los peces hembra tendían a mostrar menores concentraciones de AMH medidas que los peces macho, con algún solapamiento entre individuos en las edades observadas.

**Ejemplo 6**

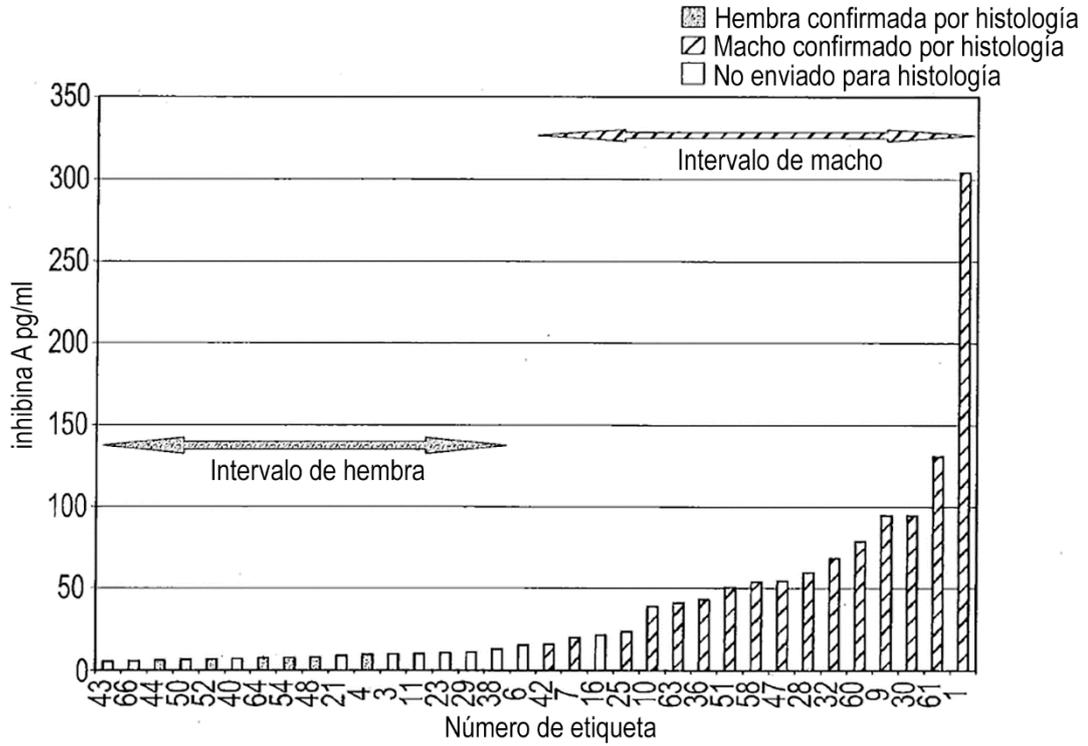
15 Usando el método del ejemplo 1, tanques que contenían esturiones de 1 a 1,5 años de edad se pudieron analizar para determinar las concentraciones de inhibina A. Los peces con concentraciones de inhibina A por debajo de aproximadamente 13 pg/ml se pudieron sacrificar y los peces con concentraciones de inhibina A por encima de aproximadamente 13 pg/ml se pudieron criar hasta la madurez y recolectar sus huevas. Los costes por tanque para realizar en análisis de ELISA serían significativamente menores que el coste de criar los peces sacrificados durante 20 3 a 4 años más.

**Ejemplo 7**

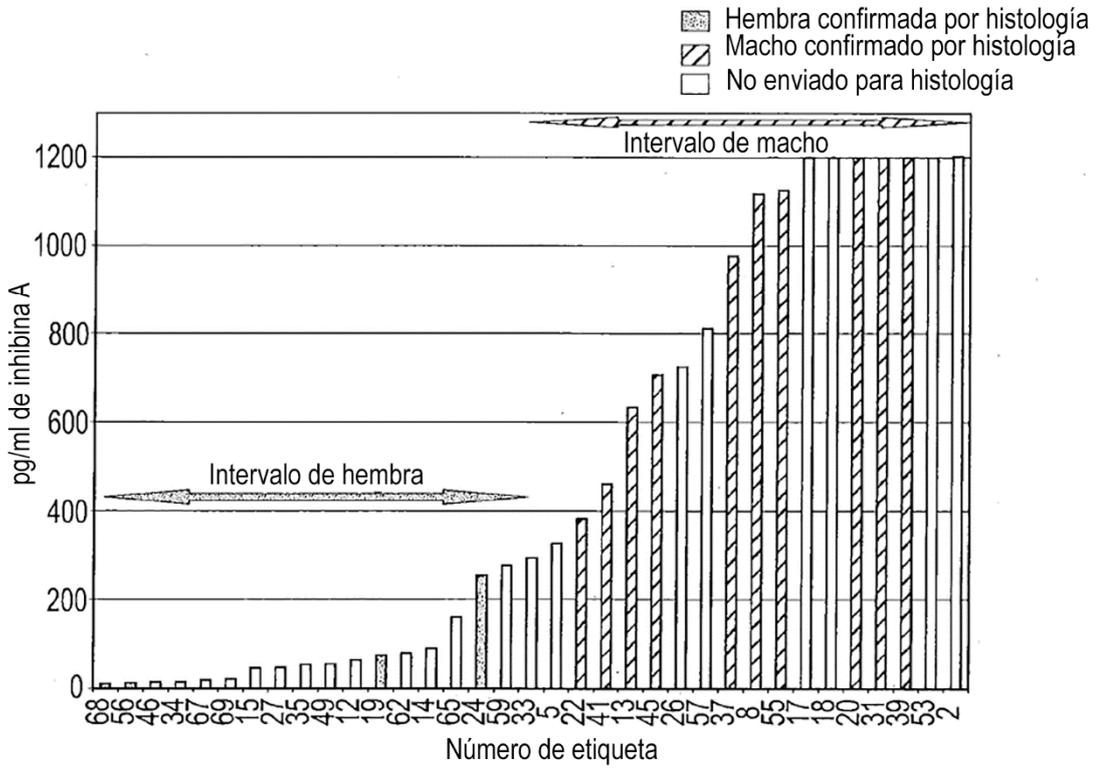
25 Un kit de prueba de campo manual **10** como el mostrado en la figura 9 se puede hacer recubriendo partes de soportes **12** con un anticuerpo de captura de acción rápida **14** y anticuerpo indicador de acción rápida **16** y encerrando varias filas de los soportes en embalaje de papel o cartón de bajo coste, protector, pero no hermético **18**. El kit se puede sujetar en una única mano con guante o sin guante y deseablemente se puede manipular para exponer sitios de pruebas nuevos usando los dedos de la misma mano. Cuando un extremo libre **20** de un soporte **12** se moja en o se expone de otra manera a una muestra de sangre completa **22**, la sangre viaja pasado el anticuerpo de captura **14** y alcanza el indicador **16**. La absorción u otras características de transmisión de fluidos de los soportes **12** y la reactividad del anticuerpo de captura **14** y el indicador **16** se seleccionan de modo de una indicación colorimétrica u otra de la concentración de hormona peptídica se proporciona en menos de 15 minutos o tal tiempo más corto como se pueda seleccionar para limitar o prevenir la asfixia de los peces mientras están fuera del agua. Según se usa cada soporte, se puede mover (por ejemplo, plegar) fuera del sitio o separar (por ejemplo, arrancar) de modo que soportes adicionales se expondrán y se pueden realizar pruebas para peces adicionales. Deseablemente, se evalúan una serie de peces a la manera de línea de producción en o cerca del agua, obteniéndose las muestras y aplicándolas a los sitios de prueba mientras las indicaciones de las concentraciones de hormona peptídica están todavía desarrollándose en sitios de prueba anteriores, y sin tener que marcar o etiquetar de otra manera los peces durante la prueba.

**REIVINDICACIONES**

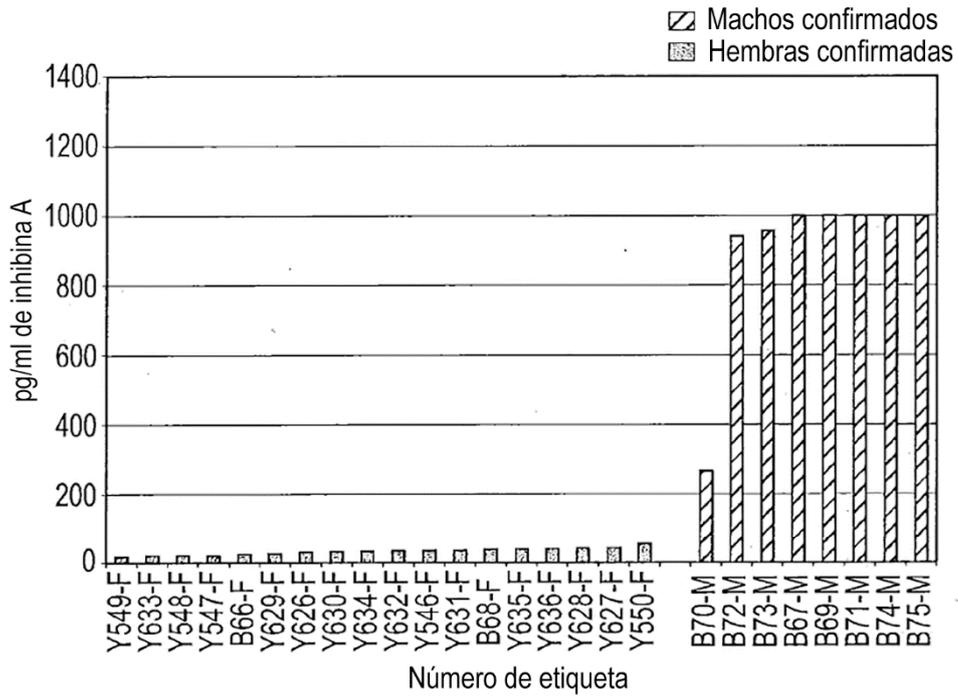
- 5 1. Un método para determinar el sexo de los peces, disponibilidad para la reproducción, o disponibilidad para la recolección de huevas, método que comprende recoger sangre de pez; opcionalmente separar el suero o plasma de tal sangre; medir la concentración en tal suero, plasma o sangre de una o más hormonas peptídicas de la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta (superfamilia TGF- $\beta$ ); y determinar el sexo del pez, disponibilidad para la reproducción, o disponibilidad para la recolección de huevas basado en la concentración de tales hormonas peptídicas.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, en donde los peces son esturiones.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en donde los peces están criados por acuicultura y tienen tres años de edad o menos.
- 15 4. Un método según la reivindicación 3, en donde los peces tienen 1,5 años de edad o menos.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la hormona peptídica comprende inhibina A.
- 20 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la hormona peptídica comprende inhibina B o AMH.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la concentración de la hormona peptídica se mide en suero o plasma.
- 25 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende determinar el sexo de los peces.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende determinar la disponibilidad para la reproducción.
- 30 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende determinar la disponibilidad para recolectar huevas.
- 35 11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los peces de muestra, o peces de muestra seleccionados que tienen un sexo deseado, se devuelven de forma no letal al agua sin asfixia.
- 40 12. Un método que comprende:
  - (a) el método para determinar el sexo de peces según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y además
  - (b) sacrificar los peces macho, criar los peces hembra restantes hasta la madurez y recolectar las huevas de los peces hembra restantes maduros.



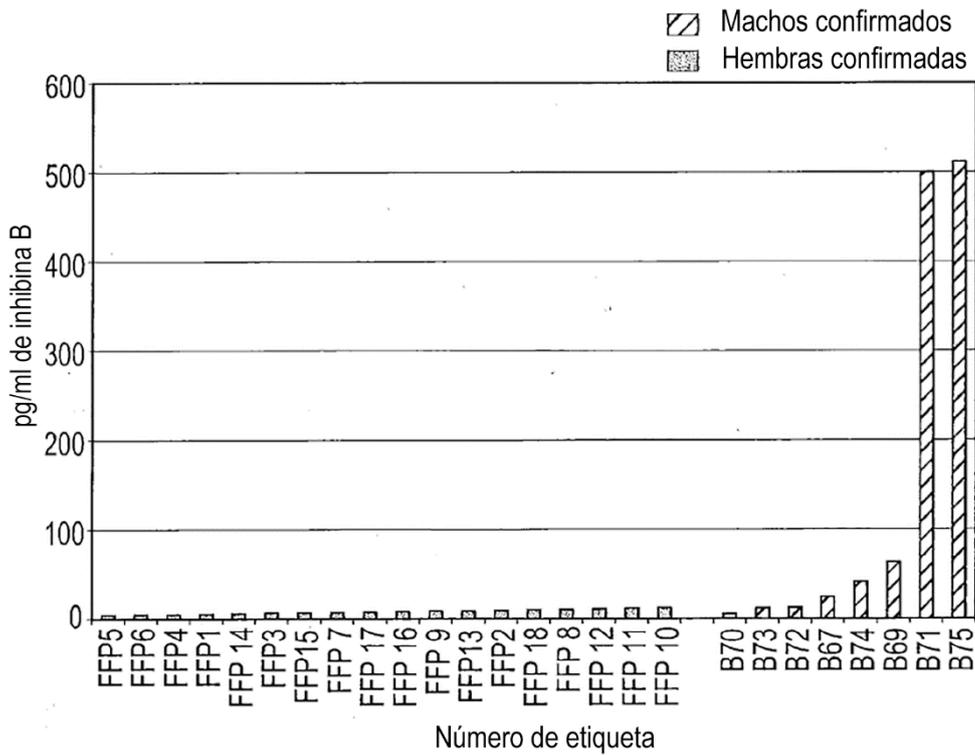
**Fig. 1**



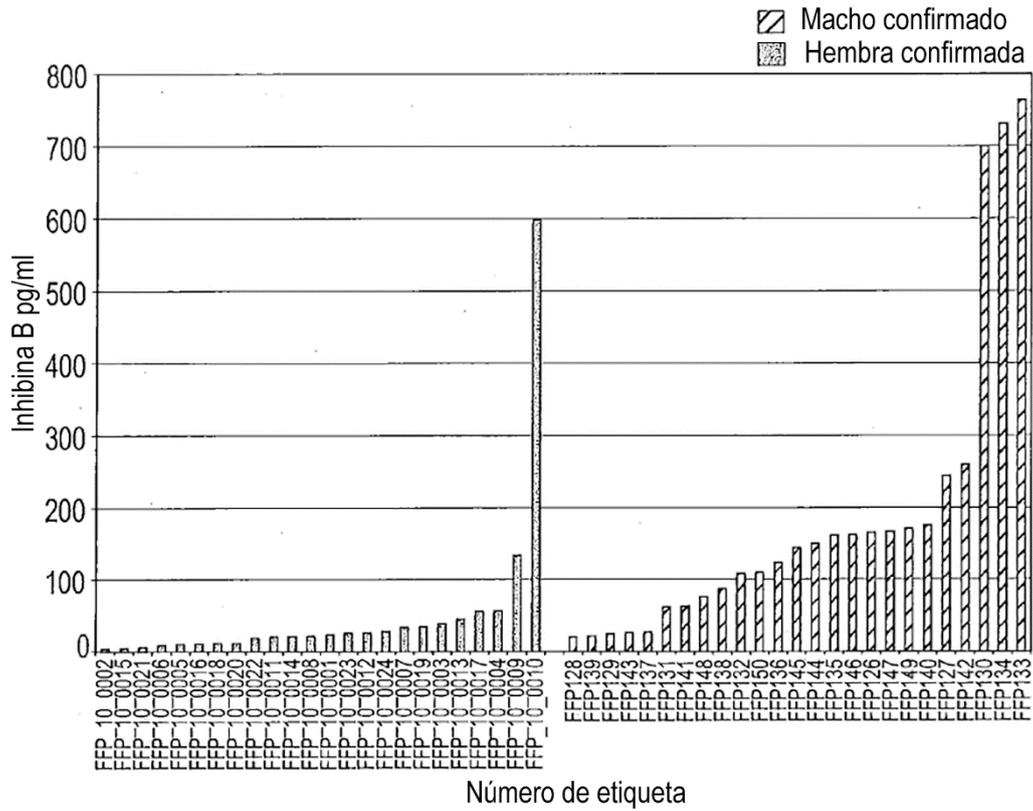
**Fig. 2**



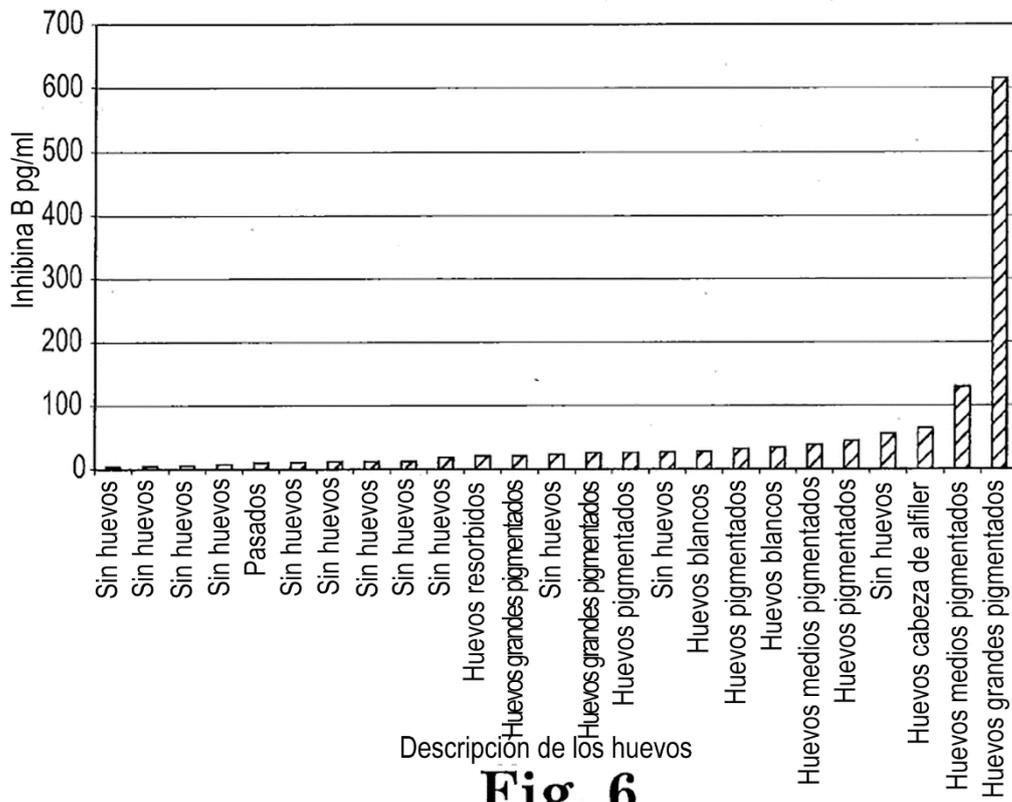
**Fig. 3**



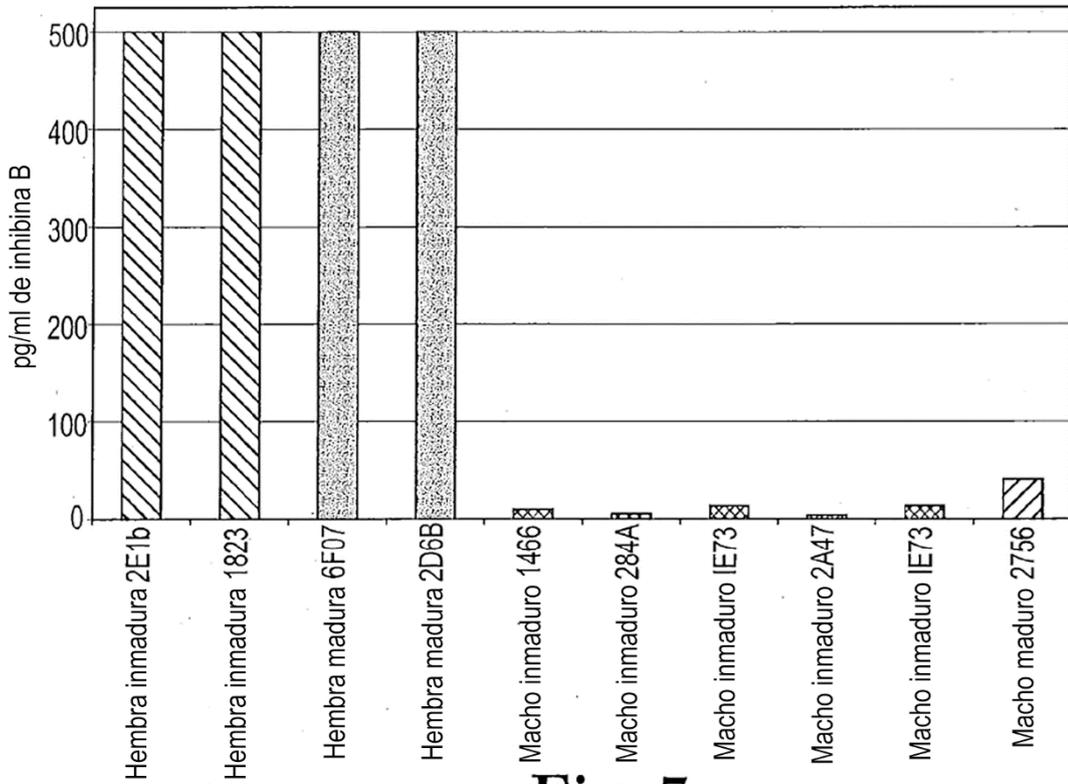
**Fig. 4**



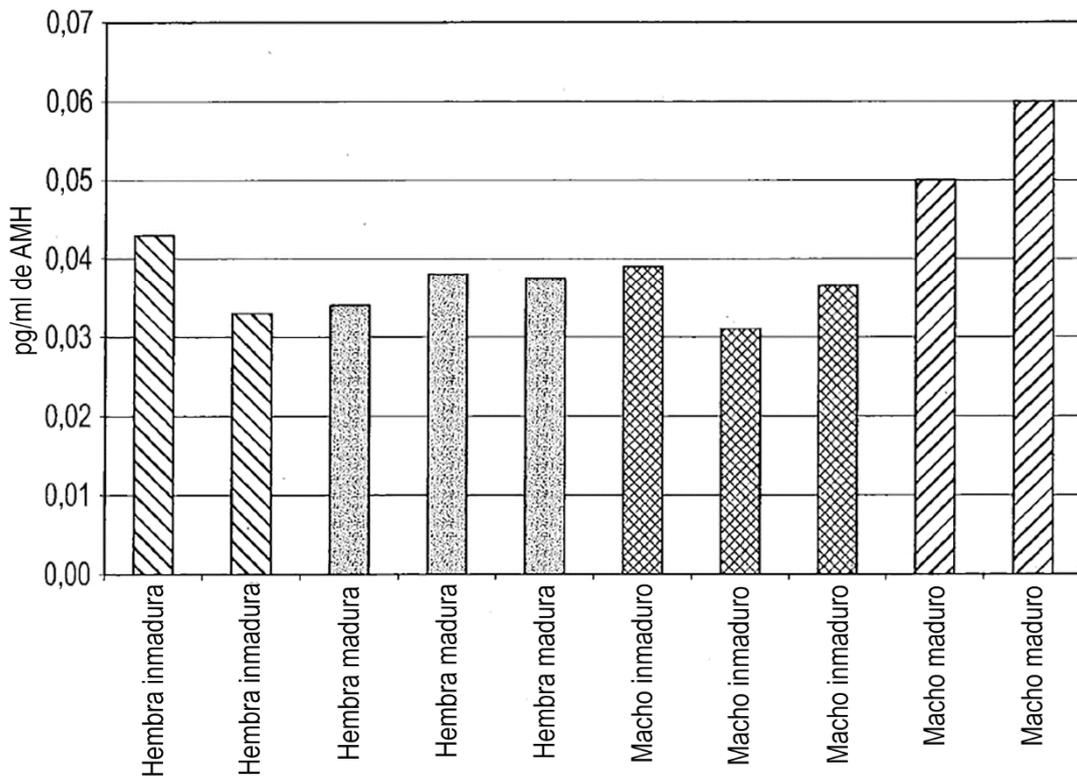
**Fig. 5**



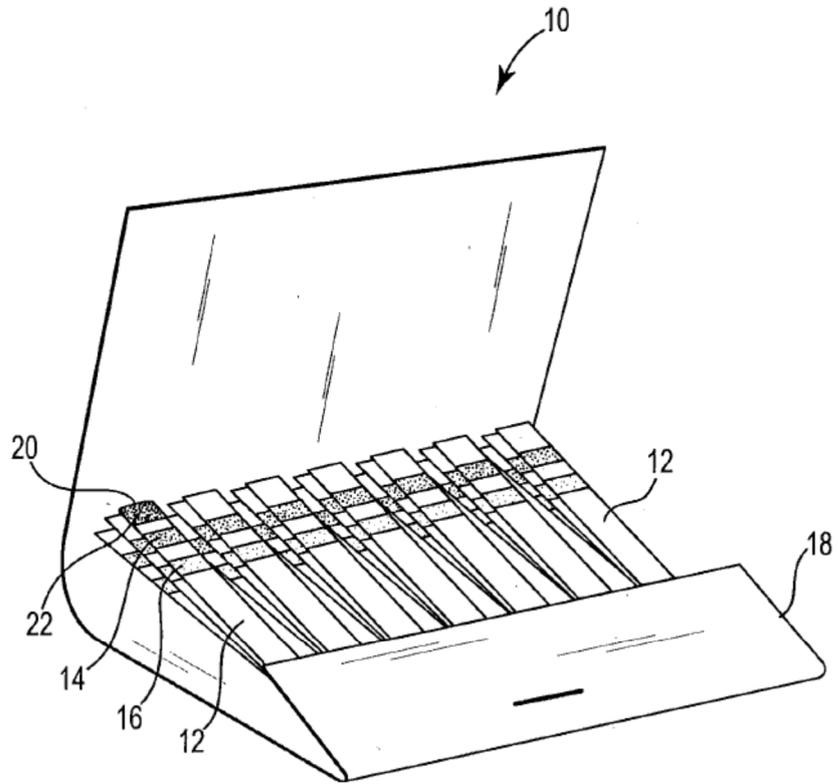
**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**