



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



EFECTO DE LA 17 α -METILTESTOSTERONA
EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DE
JUVENILES DE *Paralabrax maculatofasciatus*
(STEINDACHNER, 1868) (TELEOSTEI:
SERRANIDAE)

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO
EN
CIENCIAS MARINAS

PRESENTA
MARTÍN OSCAR ROSALES VELÁZQUEZ

LA PAZ, B. C. S. DICIEMBRE DEL 2008



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 20 del mes Noviembre del año 2008, el (la) que suscribe MC. MARTÍN OSCAR ROSALES VELÁZQUEZ alumno(a) del

Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro A040262 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo al dirección de:

DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ y cede los derechos del trabajo titulado:

"EFECTO DE LA 17 α -METILTESTOSTERONA EN LA DETERMINACIÓN SEXUAL JUVENILES

DE *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) (Teleostei: Serranidae)"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mrosales0400@ipn.mx rochoa@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. MARTÍN OSCAR ROSALES VELÁZQUEZ

nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 13 del mes de Noviembre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"EFECTO DE LA 17 α -METILTESTOSTERONA EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DE JUVENILES DE *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) (Teleostei: Serranidae)"

Presentada por el alumno:

ROSALES
Apellido paterno

VELÁZQUEZ
materno

MARTÍN OSCAR
nombre(s)

Con registro:

A	0	4	0	2	6	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ

PRESIDENTE

DR. JOSÉ LUIS CASTRO AGUIRRE

SECRETARIO

DR. AGUSTÍN HERNÁNDEZ HERRERA

SÉGUNDO VOCAL

DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO

TERCER VOCAL

DR. WILFRIDO M. CONTRERAS SÁNCHEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



**IPN
CICIMAR
DIRECCION**

Dedicatoria

Participar en este tipo de proyectos, requiere de apoyo, entendimiento, paciencia, a veces algo se sacrificio, ánimo y sobre todo mucho amor por parte de la pareja e hijos, por eso, este trabajo esta dedicado como primer punto a mi esposa,

Elvia Patricia Navarro Trejo

Por creer en mi, por creer en mis proyectos y saberse parte de ellos y compartir las alegrías, insomnios, sinsabores que de repente se presentan y por estar siempre ahí.

A mi hijo,

Oscar Rosales Navarro

Por aceptar pasar algunas vacaciones y fines de semana en el CICIMAR-IPN, por esos momentos de soledad que finalmente llegaron a una culminación, sabes que eres una parte muy importante para mi y que todo esto es por ti. Con mucho cariño, esta tesis esta dedicada para ustedes dos.

También, la dedico a mis Padres,

Teresa Velázquez Franco y Juan Rosales Romero

Por tener la dicha de que aún estén conmigo, porque aunque estén un poco lejos, se que esto les va a llenar de orgullo, saber que uno de sus hijos sigue logrando cosas.

A mi suegra,

Teresa Trejo Cornejo

Sabe que siempre la he considerado y que aprecia mucho todo lo que hago.

A mis hermanos y hermanas,

Francisca, Rocío, Margarita, Teresa, Juan, Martha, Georgina, Lourdes, Felipe, Carlos,

Norma, Cecilia, José Guadalupe, Nora, Omar, Jazmín y Tomas.

Si, somos muchos y porque se que aunque soy de los de en medio, me ven como un hermano mayor, esta dedicada a ustedes, estoy comprometido a seguir y ojala algunos de ustedes me sigan.

A todos mis sobrinos, es una lista larga, pero los llevo a todos en mis recuerdos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue un esfuerzo interdisciplinario y de equipo, indispensable en estas investigaciones, demostrándose que este tipo de colaboraciones, son posibles. Como primer punto quiero agradecer al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN, mi centro de trabajo, que me dio las facilidades y el apoyo económico para mi superación académica hacia el doctorado en ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca de posgrado y el apoyo específico para la tesis que me permitió solventar varios gastos imprevistos durante el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez, por la paciencia y dedicación en que la tesis resultara lo mejor posible, así como por sus consejos y asesoría, esos que a veces no se notan, pero que quedan permanentemente en el desarrollo personal.

Al Dr. Wilfrido Miguel Contreras Sánchez, quien empezó todo esto, después de aquel “Curso de Reproducción de Peces Teleosteos”, es indudable que aquella conversación me llevo a iniciar este tipo de estudios, algo nuevo para mi y que me dio la expectativa de resolver una incógnita.

Al M. en C. José Luís Ortiz Galindo, por la coordinación del “grupo de trabajo de piscicultura”, por la paciencia y mediación en esos momentos difíciles y de estrés, que gracias a su intervención se pudieron sobrellevar.

Al comité revisor, por los comentarios y apoyo, todo por mejorar el trabajo, que estuvo en riesgo de ser rebasado por el tiempo y que finalmente se pudo concluir, gracias por todo: Dr. José Luís Castro Aguirre, Dr. Roberto Civera Cerecedo, Dr. Iván Jesús Murillo Álvarez y al Dr. Agustín Hernández Herrera.

A los proyectos de Investigación del CICIMAR-IPN que contribuyeron a la realización de la presente tesis:

- “Inducción a la inversión sexual de la cabrilla arenera mediante la administración oral de hormonas androgénicas”. Clave SIP- 20061010

- “Efecto del nivel de ácidos grasos esenciales en la alimentación de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* sobre la calidad de embriones y larvas”. Clave SIP-20060399.
- “Efecto del nivel de inclusión del ácido araquidónico (ARA) en la nutrición de reproductores de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* sobre la calidad de embriones y larvas”. Clave SIP-200715554.
- “Efecto de la 17 alfa metiltestosterona en el crecimiento de juveniles de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*”. Clave SIP-20080895.

En particular, quiero agradecer al Dr. Iván Murillo Álvarez, por dedicar buena parte de su tiempo en la calibración, estandarización y puesta en marcha de los equipos que permitieron realizar análisis en HPLC.

Al Dr. René Torres Villegas y la Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez, del laboratorio de Morfofisiología del CICIMAR-IPN, por todo el apoyo en el uso del equipo, materiales y reactivos para realizar técnicas histológicas de gran valor para obtener información ineludible en este tipo de estudios.

A la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA, del CICIMAR-IPN), donde se llevo a cabo el larvicultivo y en si el experimento con el uso del esteroide 17 α -metiltestosterona (17 MT).

Al Laboratorio de Biología Experimental (CICIMAR-IPN), donde se mantuvieron los peces reproductores y donde se realizó la evaluación del crecimiento de los peces postratamiento.

Al Laboratorio de Química Orgánica (CICIMAR-IPN), donde se realizó la preparación del alimento y diversos análisis bioquímicos.

A la División de Ciencias Biológicas de la UJAT, de Villahermosa Tabasco, donde aprendí las técnicas en el uso y manejo del esteroide 17 MT y por facilitarme la hormona para hacer los primeros ensayos, particularmente quiero agradecer al Dr. Wilfrido Contreras Sánchez por el apoyo y asesoría durante mi estancia en la UJAT. También quiero agradecer a parte de su equipo de trabajo que me capacitó en estas técnicas; M. en C. Ulises Vidal, M. en C. Gabriel Cotounier (el “Gabo”), Rosa Aurora, Caleb, Lupita, Juan Manuel, Milciades,

Cando, Rocío, William y a todos los que de alguna manera colaboraron y me hicieron más pasadera esa estancia.

De manera muy especial al Dr. Dariel Tovar Ramírez del CIB-NOR, quién me ayudó en la determinación de la expresión de la aromatasa, de igual manera, gracias al CIB-NOR por el uso de sus instalaciones. Gracias también a Elia López Green, su ayuda fue invaluable en la realización de mis primeros ensayos moleculares. A los responsables de cada laboratorio en el que estuve; Patricia Hinojosa del Laboratorio de Fisiología Comparada, Hebert, Neftali Gutierrez y Griselda Gallegos del Laboratorio de Biología Molecular. De esta misma institución, al Dr. Roberto Civera, por esos análisis que permitieron evaluar la calidad del alimento inerte utilizado.

A la Universidad Autónoma de B.C.S. (Unidad Pichilingue), por el préstamo de material y uso de sus instalaciones, de manera particular al Dr. Cesar Ruiz Verdugo.

Al CetMar 04, de La Paz, B.C.S. por habernos permitido habilitar un laboratorio de producción de alimento vivo, el cual nos abasteció de este alimento durante el experimento. Gracias a los profesores; Alfonso Orozco, Rito Palomares y Carlos Payan.

A mis compañeros y amigos del grupo de trabajo de piscicultura marina, con la cabrilla arenosa: Juan Manuel Martínez Brown, Alfredo Pérez Morales, a los profesores Tanos Grayeb del Alamo, gracias por asegurarme el abastecimiento de alimento vivo, M. en C. Víctor Carrasco Chávez, gracias por los análisis bioquímicos de la calidad del agua y por el acondicionamiento del área de larvicultivo de la UPIMA.

A los estudiantes y compañeros que directamente estuvieron involucrados en el equipo de trabajo: Laura Guzmán (CIB-NOR), Cristian Liñan (CIB-NOR), Sandra Enciso Lizarraga (CICIMAR-IPN) y Mariana Rodríguez Trejo (CICIMAR-IPN).

Definitivamente hay más gente, espero que disculpen la omisión de sus nombres pues sería difícil nombrar a todos, **GRACIAS**.

INDICE	i
Glosario	iv
Lista de Tablas	vi
Lista de figuras	viii
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	6
2.1 Hermafroditismo	7
2.2 Patrones reproductivos en la cabrilla arenera	7
a) Gonocorismo en la cabrilla arenera	7
b) Protoginismo en la cabrilla arenera	8
c) Protoginismo diándrico.	8
d) Protoginismo poliándrico	9
2.3 Determinación del sexo por métodos hormonales exógenos	9
2.4 Alteraciones en el mecanismo de la determinación sexual	12
2.5 Eje cerebro-hipófisis-gónada	14
2.6 Cultivo de la cabrilla arenera	15
3. Hipótesis	17
4. Justificación	17
5. Objetivos	19
6. Materiales y Métodos	20
6.1 Identificación del período lábil de la cabrilla arenera	20
6.2 Captura y acondicionamiento de reproductores.	24
6.3 Cría larvaria de la cabrilla arenera	27
6.4 Diferenciación de células germinales en juveniles de cabrilla arenera	31
6.5 Enriquecimiento del alimento inerte con la 17 MT	33
6.6 Juveniles de cabrilla arenera sometidos a tratamientos con 17 MT	35
6.7 Evaluación del crecimiento de cabrilla arenera post-tratamientos	38

6.8	Determinación cuantitativa de 17 MT en el agua del Sistema Cerrado-18.	41
6.9	Cuantificación de ARNm codificante para aromatasa en la cabrilla arenera.	43
6.10	Análisis estadístico	46
7.	Resultados	47
7.1	Identificación del periodo lábil en la cabrilla arenera	47
7.2	Captura y acondicionamiento de los reproductores	50
7.3	Cría larvaria de la cabrilla arenera	52
7.4	Diferenciación de células germinales en juveniles de cabrilla arenera	54
7.5	Enriquecimiento del alimento inerte con la 17 MT	57
7.6	Juveniles de cabrilla arenera sometidos a tratamientos con 17 MT	57
7.7	Evaluación del crecimiento de cabrilla arenera post-tratamientos	61
7.8	Determinación cuantitativa de la 17 MT en el sistema de larvicultivo.	68
7.9	Cuantificación de ARNm codificante para aromatasa en la cabrilla arenera.	70
8.	Discusión	74
8.1	Predicción del periodo lábil en la cabrilla arenera	74
8.2	Captura y acondicionamiento de reproductores	75
8.3	Cría larvaria de la cabrilla arenera	75
8.4	Enriquecimiento del alimento inerte con 17 MT	76
8.5	Determinación del efecto de administración dosis y tiempo de la 17 MT en la masculinización de la cabrilla arenera	77
8.6	Desarrollo gonadal por efecto del suministro de la 17 MT	81
8.7	Crecimiento de la cabrilla arenera post-tratamiento	85
8.8	Cuantificación de ARNm codificante para aromatasa en la cabrilla arenera.	88
9.	Conclusiones	91

10. Recomendaciones para trabajos futuros	93
11. Bibliografía	95

GLOSARIO

Acinos.- Pequeñas criptas más o menos cilíndricas, en donde todas las células de la cripta tienen la misma etapa de meiosis. Están rodeadas por membranas de tejido conectivo las cuales se rompen cuando el esperma alcanza su madurez (Smith, 1965).

Aromatasa.- Es la enzima responsable de la conversión de andrógenos (testosterona y androstenediona) en estrógenos (estradiol y estroma, respectivamente) (González-Cabeza, 2003).

Citocromo P450 aromatasa.- Miembro de la superfamilia de citocromos P450, compuesta por 480 miembros repartidos en 74 familias. La 450 aromatasa es el único miembro de la familia 19 dentro del subgrupo de hidrolasas de esteroides, con una mayor especificidad catalítica por el metabolismo de esteroides que otros citocromos P450 (González-Cabeza, 2003).

Coalimentación.- Proceso durante el cual se combinan dos tipos de alimentos

Debris celular: los organelos, membrana etc, es la parte insoluble cuando se hace una extracción o lisado celular después de centrifugarlo o precipitarlo.

Determinación sexual.- La determinación sexual se puede definir como la suma de elementos genéticos que son responsables de la existencia de las gónadas. Los genes que determinan el sexo podrían no ser responsables de la presencia de las gónadas pero si de su forma (órganos pareados o fusionados), donde ellos pueden diferenciarse en testículos o en ovarios (pueden tener o no una cavidad ovárica) (Devlin y Nagahama, 2002).

Diandría.- Condición en la que los machos de una especie son de dos tipos: aquellos derivados de hembras por medio de transformación sexual y los que nacen y se mantienen como machos (Sadovy y Shapiro, 1987).

Diferenciación sexual.- Durante la expresión o manifestación del sexo, la diferenciación es responsable del desarrollo de distintos tipos de gónadas, ovarios o testículos (sexo fenotípico)(Piferrer, 2001).

Especie Hermafrodita.- Si una sustancial proporción de individuos en una población funciona con ambos sexos, ya sea secuencial o simultáneamente en alguna parte de su vida (Sadovy y Shapiro, 1987).

Hermafroditismo protogínico.- Hermafroditismo en el cual algunos o todos los individuos funcionan primero como hembras y más tarde funcionan exclusivamente como machos (Sadovy y Shapiro, 1987).

Hermafroditismo protandrico.- El cambio de sexos es de machos a hembras (Sadovy y Shapiro, 1987).

Hermafroditismo simultáneo.- Los individuos funcionan al mismo tiempo de su vida como machos y hembras (Sadovy y Shapiro, 1987).

Hormonas esteroides.- Consisten de anillos de carbono, siendo el núcleo ciclopentano perhidrofenantreno la unidad básica. Se forman a partir del colesterol como precursor. Los esteroides sexuales comprenden los andrógenos, estrógenos y progestágenos (González-Cabeza, 2003).

Inversión sexual.- Inducción sexual dirigida, para la obtención de machos o hembras, a partir de células indiferenciadas.

Machos alfa.- También llamados machos primarios, son machos de especies progénicas que así se diferencian sexualmente en la primera madurez y permanecen de este modo durante todo su ciclo de vida (Hovey y Allen, 2002).

Machos fenotípicos.- Machos obtenidos de la masculinización de hembras (reversión sexual) (Hendry et al., 2003).

Monosexo.- Expresión fenotípica de un solo sexo

Neomachos.- Machos fenotípicos inducidos a partir de hembras genotípicas (Blázquez et al., 1995)

Ovoplasma.- Citoplasma del óvulo el cual ha aumentado de cantidad y calidad, mediante la elaboración y distribución regular de varias inclusiones celulares esenciales para el desarrollo del embrión (Ruiz-Dura, 1988).

Periodo lábil.- Se define como el periodo de tiempo cuando las gónadas aun no se han diferenciado y están más expuestas a la acción de los esteroides (Nakamura y Takashi, 1973, In Piferrer, 2001).

Reversión sexual.- la transformación sexual de machos a hembras o viceversa, esta puede ser inducida o de manera natural.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Análisis químico reportado por el fabricante del alimento comercial Lansy CW™, utilizado durante el primer mes de los experimentos, enriquecido con 17 MT.	29
Tabla 2	Diseño experimental para determinar la dosis y tiempo de aplicación del esteroide 17 MT en juveniles de cabrilla arenera.	35
Tabla 3	Relación de la ración de alimento suministrado por tratamiento, con respecto al día DE y número de peces.	36
Tabla 4	Análisis proximal del alimento comercial Lansy CW™, utilizado durante el segundo y tercer mes de los experimentos con la 17 MT	37
Tabla 5	Programa de elusión para establecer el método para la determinación de la 17 MT, mediante el HPLC.	41
Tabla 6	Concentración final de la 17 MT inyectada al HPLC en el tiempo de retención, área bajo la curva y altura del pico.	42
Tabla 7	Oligonucleótidos diseñados para amplificar por PCR.	45
Tabla 8	Biometría inicial de los reproductores, el desove provino del tanque 6 (recuadros coloreados).	50
Tabla 9	Resultados de la calidad del desove utilizado.	51
Tabla 10	Datos de eclosión y supervivencia de larvas de cabrilla arenera.	52
Tabla 11	Relación de pesos (g) y longitud notocordal (mm) de la cabrilla arenera al finalizar 30 DDE (n= 15).	53
Tabla 12	Relación de peso y talla de los peces mostrados en el análisis histológico de la figura 28	56
Tabla 13	Estado de las gónadas al finalizar el primer mes de tratamientos con 17 MT. En el recuadro “sin diagnóstico”, no se pudo determinar la presencia de células germinales.	57
Tabla 14	Evaluación de las gónadas al finalizar el segundo mes de tratamientos con 17 MT.	58
Tabla 15	Relación de las gónadas evaluadas mediante análisis	58

	histológico.	
Tabla 16	Relación del Factor de Condición, se presentan los valores promedios.	66
Tabla 17	Rotulación y control de las muestras de cabrilla arenera (<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>) a las que se le realizó la extracción de RNA y la retrotranscripción según el día de muestreo.	69
Tabla 18	Comparación de eventos de la diferenciación sexual con respecto a la longitud (mm) en <i>P. maculatofasciatus</i> .	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vista longitudinal de una gónada de <i>Cephalopholis fulva</i> . A) mesenterio; B) vejiga urinaria; C) ducto urinario; D) ducto espermático; E) contacto del oviducto; F) canal de liberación de oocitos; G) abultamiento genital; H) lámelas del ovario; I) lumen del ovario; J) recto (tomado de Smith, 1965).	5
Figura 2	Corte histológico de una gónada indiferenciada de un juvenil de <i>Salmo trutta</i> de 3 meses de edad. GC) gonocito (tomado de Dziewulska y Domagała, 2004).	10
Figura 3	Se muestra el periodo lábil, este varía dependiendo de la especie y puede ocurrir desde la fertilización hasta que ocurran las primeras señales de diferenciación sexual (tomado de Piferrer, 2001).	11
Figura 4	Modelo hipotético de los mecanismos moleculares durante el cambio de sexo en serranidos hermafroditas. ⊥ inhibición, ↓ activación (Tomado de Zhou y Giu, 2008).	13
Figura 5	Esquema de aromatización se transforma en estrona, ácido fórmico y agua. Modificado de Simpson et al., 1994.	13
Figura 6	Eje cerebro-hipófisis-gónada en teleósteos machos (Tomado de Weltzien et al., 2004).	15
Figura 7	Gónada de <i>Cephalopholis fulva</i> , se muestran las etapas 1, 2, 3 y 4 del desarrollo del oocito (tomado de Smith, 1965).	21
Figura 8	Gónada de <i>Cephalopholis fulva</i> , A) Gónada recientemente transformada con remanentes de oocitos etapa 2; B) Macho con sinus (s) espermático lleno de esperma (tomado de Smith, 1965).	23
Figura 9	Área de captura de los reproductores de la cabrilla arenera, localidad "las pacas".	24
Figura 10	Sistema cerrado de inducción al desove (SCID), lugar donde se mantuvieron los reproductores de cabrilla y de los	25

	cuales se obtuvo el desove para iniciar el experimento.	
Figura 11	Sistema Cerrado de 18 tanques (SC-18).	27
Figura 12	Protocolo de alimentación de larvas de cabrilla arenera.	28
Figura 13	SCID, lugar donde se dio seguimiento al crecimiento de los peces una vez finalizados los tratamientos con 17 MT.	38
Figura 14	Segmento cortado de cabrilla arenera para el análisis de la actividad de aromatasa.	43
Figura 15	Condiciones de corrimiento por PCR	45
Figura 16	Distribución de tallas de los ejemplares de cabrilla arenera, analizados para determinar la longitud en que aparecen las células germinales.	47
Figura 17	Células germinales (cg) a partir de ejemplares de 18 mm cultivados en laboratorio. Los cortes histológicos se tiñeron con la técnica Tricómica de Mallory.	48
Figura 18	Ejemplar de cabrilla arenera recolectado en campo. Se observan oocitos perinucleolares (op). Los cortes fueron teñidos usando la técnica de tinción Tricrómica de Mallory.	49
Figura 19	Comportamiento reproductivo de la cabrilla en las instalaciones del CICIMAR indicado como volumen de desoves.	51
Figura 20	Juvenil de cabrilla arenera al momento de finalizar los 30 DDE.	53
Figura 21	Gonias de 2 ejemplares de juveniles de cabrilla de 30 DDE. Las células germinativas, se ubican por la posición y por ser estructuras pareadas.	54
Figura 22	Cortes histológicos de gónadas obtenidas a los 60 DDE. Los cortes corresponden a los tratamientos control (I), 15 mg/Kg (II), 30 mg/Kg (III) y 60 mg/Kg (IV). En todos los casos se observa un desarrollo avanzado de tejido testicular, pudiéndose apreciar espermatogonias (A), espermatocitos (B), espermatides (C) y espermatozoides	55

	(D).	
Figura 23	Se aprecia una fotografía con una gónada y vejiga natatoria (VN) bien desarrollados (pez control) (A) y una fotografía donde no hubo desarrollo ni de gónada ni VN (pez con 17 MT) (B).	59
Figura 24	Casos con poco desarrollo o desarrollo anormal de la gónada: en la fotografía A; se aprecia la gónada en poco desarrollada y sin conducto aparente al exterior (tampoco hay Vejiga Natatoria, VN), en la fotografía B; si se desarrollo la VN pero la gónada tiene una forma cúbica y tampoco se observan conductos al exterior; C, la gónada muestra una forma peculiar con segmentos esféricos pequeños (como pequeño “rosario”); finalmente en D, no hay presencia de gónada aunque si de la VN, todos los casos son de peces tratados con 17 MT.	60
Figura 25	Líneas de crecimiento indicando valores promedio de la ganancia mensual en peso (\pm IC). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos están señaladas con flechas.	61
Figura 26	Diagramas de caja de los valores de peso observado (mensualmente), correspondiente a los análisis de variancia. Las flechas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.	62
Figura 27	Valores promedio (\pm IC) del crecimiento en longitud (cm) observado a lo largo del experimento.	63
Figura 28	Dispersión de datos de la longitud patrón por tratamiento de ejemplares de la cabrilla arenera durante el experimento.	64
Figura 29	Índice de correlación de individuos de la cabrilla arenera (todas las biometrías mensuales y tratamientos).	65
Figura 30	Relación peso-longitud por tratamientos del día 30 al 297 DE, de la cabrilla arenera.	65
Figura 31	Valores promedio del Índice Gonadosomático (\pm IC). Letras	66

	desiguales indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.	
Figura 32	Valores promedio del Índice hepatosomático (\pm IC). Letras desiguales indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.	67
Figura 33	Gráfica de la detección de 17 MT en el agua de la cisterna, el círculo señala la posición (17 min.) donde debería detectarse la presencia de la 17 MT.	68
Figura 34	Se muestran los cromatogramas de la 17 MT a 1 μ g (A) y 0.1 μ g (B). Se observa que el pico alrededor de los 17 minutos (ovalado rojo) decrece cuantitativamente con la concentración de la 17 MT. El resto de picos son atribuibles a impurezas del disolvente (etanol).	69
Figura 35	Expresión de la aromatasa (tanque 1) reflejada en 239 pares de bases (se aprecia entre las líneas paralelas de color verde).	71
Figura 36	Curva estándar 18S, para calibrar la expresión del gen que codifica la aromatasa.	72
Figura 37	Curva estándar de la aromatasa.	72
Figura 38	Se muestran en A, B, C y D, la expresión de la aromatasa en los diferentes tratamientos incluido el grupo control.	73

Resumen

El conocimiento de una especie para piscicultura incluye diversos aspectos, uno de los más relevantes es el mecanismo biológico de la determinación y diferenciación sexual. Pretende manipular la obtención de poblaciones de individuos de un solo sexo. La producción de poblaciones de monosexo tiene como finalidad inhibir la reproducción de los peces; con el propósito, de dirigir el gasto energético del organismo al crecimiento somático en una etapa temprana de la vida de la especie. Para la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), debido a su condición protogínica, se planteó como estrategia producir en el laboratorio poblaciones de individuos del sexo masculino. En el presente trabajo se empleó un método que utiliza la administración de andrógenos empleándose 17 α -Metiltestosterona de origen sintético (MT; Sigma No. M-7252). El esteroide fue administrado vía oral por medio del alimento inerte. El diseño experimental estuvo dirigido a probar el efecto del esteroide a través de dos factores: el tiempo de exposición y la dosis suministrada. Fueron utilizadas dosis en cuatro niveles de concentración (0, 15, 30 y 60 mg/kg de alimento) y el tiempo de exposición, en tres periodos de tratamiento (30, 60 y 90 días de administración), con tres réplicas cada uno. Los adultos reproductores empleados fueron producidos y acondicionados en laboratorio previo al tratamiento. El seguimiento de la formación de la gónada se realizó por histología en muestras semanales a partir de los 30 DDE. Se comprobó el efecto de la 17 MT en la maduración precoz en la cabrilla arenera a los 60 DDE (30 días de suministro con el esteroide), se lograron gónadas con actividad espermática en individuos de 27.3 mm de L.P. Según los resultados obtenidos, se registró que los tratamientos empleados fueron excesivos y drásticos para el desarrollo de la gónada. Como consecuencia, el 50% de los peces no formaron la gónada y el otro 50% tuvieron malformaciones, lo cual resultó en el 100% de esterilidad de la población estudiada. La expresión del gen que codifica a la enzima aromatasa, confirmó la protoginia de la cabrilla arenera, al denotar la presencia de hembras genotípicas, con el fenotipo de machos. Además, no se detectó la presencia del esteroide en el agua del sistema de cultivo

evaluada por HPLC. Es probable, que la luz ultravioleta al actuar sobre la 17 MT la desdoble en otros metabolitos con efecto masculinizante; de esa manera se explican los resultados en el grupo control. Los valores altos del índice gonadosomático (IGS), confirman el efecto de la 17 MT en los peces control, detectándose una diferencia significativa con respecto a los peces sometidos a los tratamientos. Se concluye que la dosis de 15 mg/Kg de 17 MT y, suministrada en 30 días de exposición, fueron dosis y tiempo suficientes que bien pueden aceptarse como adecuados para generar un 100 % de esterilidad y evitar la reproducción de los peces tratados. Desde estos puntos de vista, se concluye que, el diseño experimental logró cumplir con el objetivo planteado originalmente y confirmó la hipótesis.

Abstract

Knowledge of a species for aquaculture includes diverse factors that must be studied and understood in detail. The most relevant are the biological mechanism by which determination and sex differentiation occurs in a species and the feasibility of manipulating sex differentiation to obtain a single sex population. Production of monosex populations appear to yield the gender with a faster growth, the avoidance of reproduction, and directing the energetic budget to somatic growth. Because of its protogynic condition, we have proposed the use of all male populations for aquaculture of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*). In our study we used the method most employed to obtain masculinization by using the oral administration of 17 α -Methyltestosterone (17MT; Sigma No. M-7252), which favors development of testes. 17MT was administered by using an inert food. A two-factor experimental design (time of administration and dosage) was used to evaluate the effect of steroid use on the resulting percentage of males. Four dosages (0, 15, 30, and 60 mg/kg of food) and three times of administration (30, 60, and 90 days) were evaluated. Each treatment was made in three replicates. The broodstocks were conditioned in captivity before starting the experiment. The results indicate that all treatments (including the lowest one with 15 mg/kg administered for 30 days) were excessive and drastic to gonadal development. Consequently, about 50% of the fish had no gonads and the rest had abnormal gonads, which can be interpreted as 100% sterility. Gonadal development was observed using histological analysis of weekly samples starting on day 30 and finishing 120 days posthatching (dph). This histological analysis could not be done adequately because of a high precocity (higher than previously reported). The effect of 17MT in the precocious maturation was proved, because testes with spermatic activity were detected 30 days after treatment (60 dph), which began at a fork length of 27.3 mm (30 mg/kg). The expression of genes that code for aromatase were detected and this proves the protogynic condition of the spotted sand bass. Water used in the control treatment was evaluated to detect the possible presence of 17MT because there was evidence of masculinization in the

control group. The result of this analysis was negative; no 17MT was detected in the water, but it is possible that 17MT had been converted to metabolites with the same activity in masculinization. This could prove the cause of masculinization in the control group. The gonosomatic index was the most relevant result. There were significant differences between fish in the control group and those from treatments. This could be an indication the effects of MT17 on gonadal development, when doses were too high and caused undeveloped, underdeveloped, or unformed gonads. I conclude that treatment with 15 mg/kg 17MT for 30 days is sufficient to cause 100% sterility, completely stopping reproduction in this species. The objective principal to inhibit reproduction was obtained.

1. INTRODUCCIÓN

Al tratar de obtener conocimiento de una especie íctica con fines de cultivo, es necesario manipular su desarrollo y crecimiento para controlar su producción.

Este manejo se puede hacer en diferentes aspectos, uno de los más relevantes es la reproducción. Es fundamental garantizar la producción de semilla y del éxito en el control de la reproducción de la especie seleccionada, los logros se reflejarán en las etapas subsecuentes del cultivo.

Una parte fundamental de la acuicultura es lograr un crecimiento adecuado, debido al costo que representan los insumos utilizados durante la alimentación de los ejemplares, lo cual determinará la rentabilidad del cultivo. Inherente a la alimentación, es importante lograr un crecimiento rápido.

Son principios ineludibles en el sistema de cultivo, la formación de las gónadas y la producción de gametos fértiles que conlleven a la reproducción y preservación de las especies en cautiverio y cualquier estudio enfocado hacia este rubro.

Los mecanismos de la determinación sexual no están bien descritos todavía, aunque en las últimas décadas se han logrado algunos adelantos, en particular es trascendental la fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Weltzien *et al.*, 2004). El funcionamiento de este sistema endógeno sometido a la influencia de factores externos, son capaces de modificar su estado y cambiar el curso de los procesos que controla (González-Cabeza, 2003).

Este eje hipotálamo-hipófisis-gónada consiste de tres componentes conectados en su función a través del torrente circulatorio. Las neuronas neuroendocrinas en la región preóptica del cerebro, forman una interface entre el sistema nervioso central y el sistema endocrino. De estas estructuras emergen compuestos inhibidores y estimuladores, que producen hormonas liberadoras de gonadotropinas (Gnr, por sus siglas en ingles). En los teleósteos, las neuronas de la GnRH están invadas directamente a las células productoras de gonadotropinas (gonadotropas) en la pituitaria, la estimulación, producción y liberación de dos gonadotropinas químicamente relacionadas (GtHs), la hormona folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH) son liberadas en la circulación y estimulan las gónada por unión con los receptores específicos de la membrana.

Las gónadas producen células germinales durante la gametogénesis y también esteroides sexuales; algunos factores de crecimiento importantes participantes en la regulación de la reproducción, directamente en el tejido gonadal un mecanismo paracrino o autocrino de retroalimentación positivo o negativo, sobre la pituitaria y el hipotálamo en una reacción endocrina Weltzien *et al.* (2004).

A este respecto, se sabe que el origen y desarrollo de las estructuras que participan en este proceso son similares entre los vertebrados (Devlin y Nagahama, 2002; Matsuda, 2003). En común el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, es la parte medular en los mecanismos en la secreción y síntesis de esteroides responsables en la determinación y diferenciación sexual (Holloway y Leatherland, 1998; Weltzien *et al.*, 2004).

Así mismo, el entendimiento del proceso antes descrito permitirá plantear una posible manipulación y en consecuencia, la administración de alguna especie en particular. Por lo tanto, es importante conocer de qué manera se lleva a cabo la formación y el desarrollo de las gónadas. Se presume que la reversión sexual en peces sucede cuando el tejido gonadal, células germinales y ductos asociados son sensitivos y responden a un balance de estrógenos y andrógenos (Jameson, 1988).

Tomándose como base la gran plasticidad para manipular el sexo en los peces y los diversos sistemas de determinación sexual, se deben buscar metodologías que permitan realizar la experimentación de la mejor manera, para alcanzar el objetivo. Se han realizado numerosas investigaciones en respuesta a la importancia por controlar la expresión del sexo, desde el punto de vista científico y con fines comerciales. Debido a esto último, se han desarrollado métodos hormonales para modificar el proceso de determinación sexual (Beardmore *et al.*, 2001).

La manipulación debe relacionarse con el control de la reproducción, debido a que una intensa actividad reproductiva puede reflejarse en un crecimiento lento, entonces para lograr un mejor crecimiento, la tendencia debe enfocarse a evitar la reproducción a temprana edad. Para abordar el problema de la reproducción no deseada, se han utilizado algunos métodos que incluyen la producción de organismos estériles, híbridos o monosexos (Beardmore *et al.*, 2001).

En el cultivo de especies de un solo sexo, existen varios métodos para la obtención de machos, entre los más utilizados y eficientes se encuentra la reversión sexual mediante la administración oral de la 17 MT (17 α -metiltestosterona). Esta es la más comúnmente utilizada en especies gonocóricas como en *Pomoxis nigromaculatus* (Al-ablani y Phelps, 1997) y *Paralichthys olivaceus* (Yamamoto, 1989), con excelentes resultados. Aunque también se ha empleado con éxito en especies hermafroditas, por ejemplo; en *Dicentrarchus labrax* (Blázquez *et al.*, 1995; Chatain *et al.*, 1999). Por otra parte, en la tilapia *Oreochromis niloticus* la reversión sexual, en la producción comercial de monosexos machos (Beardmore *et al.*, 2001), permite alcanzar tallas comerciales uniformes (Vera Cruz y Mair, 1994).

Durante el desarrollo de las investigaciones realizadas en la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), se ha detectado una problemática para fines de cultivo, relacionada directamente con su reproducción precoz. Esto último, resulta ser limitante de su crecimiento debido al alto costo energético que representa la producción de gametos y la puesta. Es indudable que durante la reproducción hay un desgaste energético y se ha señalado de manera general para peces, que la curva típica de crecimiento presenta un desarrollo acelerado durante los primeros meses o años de vida, antes de la primera maduración (Moyle y Cech, 1988).

Considerando las características reproductivas de la cabrilla arenera, en especial su condición protogínica (Hastings, 1989; Oda *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1995; Hovey y Allen, 2000), la posibilidad de tener hembras no resolvería el problema de la maduración precoz, ya que debido a la reversión sexual natural en este tipo de especies y con la posibilidad de que se presenten los dos sexos, el problema no estaría resuelto. Por ello la producción de monosexos machos se contempla como una posibilidad para reducir el gasto energético requerido durante la producción de gametos. Así, la energía invertida para esto podría utilizarse en el incremento de talla y peso, adecuado para su cultivo. Mair *et al.* (1997) reportaron que el cultivo de monosexos machos para *Oreochromis niloticus*, solucionó el problema de la maduración precoz y lograron el control de su reproducción, mejorándose así su crecimiento.

Como primer punto, es necesario conocer los cambios que ocurren durante el desarrollo gonádico y encontrar las tallas en la que se presentan la diferenciación sexual y la primera madurez. Con este conocimiento podría ser posible inferir sobre su desarrollo, ya aplicado para otras especies como: *Oreochromis niloticus* (Mair *et al.*, 1997); *Pomoxis nigromaculatus* (Al-ablani y Phelps, 1997); *Paralichthys olivaceus* (Yamamoto, 1989); *Dicentrarchus labrax* (Blázquez *et al.*, 1995; Chatain *et al.*, 1999); entre otras.

Las gónadas de los peces en general son lábiles, con relación a la determinación sexual. Ello responde a las estrategias reproductivas de una población para la supervivencia de la especie y asegurar el éxito reproductivo (Wootton, 1989). Los sistemas reproductivos y patrones de comportamiento sexual en los peces son variados y se presentan diferentes mecanismos genéticos de determinación sexual (Pitcher, 1996).

En algunos peces Serranidos, entre estos; *Cephalopholis fulva* (Linnaeus, 1758), *C. cruentata* (Lácepede, 1802), *Serranus tigrinus* (Bloch, 1790), *Epinephelus striatus* (Bloch, 1792), *E. adscensionis* (Osbeck, 1765), *E. guttatus* (Linnaeus, 1758) *Priacantus arenatus* (Cuvier, 1829), la gónada consiste de un saco hueco, situado debajo de la parte posterior de la vejiga natatoria y conectada a ésta por el mesenterio (Smith, 1965). . Las gónadas son órganos pares de tamaño desigual, unidas en la parte posterior por un ducto hacia la región genital, a un lado del ano. La vejiga urinaria tiene un conducto cercano en la parte posterior del conducto gonadal. La gónada esta soportada por el mesenterio, va hacia adelante del extremo anterior de cada gónada con un complejo de ligamentos y mesenterios hacia el extremo anterior de la vejiga natatoria. Las arterias y venas genitales entran a la gónada por estos ligamentos y continúan en la pared dorsal de la gónada (Smith, 1965).

La pared de la gónada está cubierta en su parte externa con una capa peritoneal. La pared misma se compone de músculo liso y tejido conectivo; grandes órganos tienen más tejido conectivo que órganos más pequeños.

Los oocitos son liberados dentro del lumen y viajan a través del oviducto (Figura 1). El espermatozoides por su parte, no entra al lumen y es liberado por un ducto

espermático ubicado en la pared posterior del oviducto, que termina con el ducto urinario en la parte posterior final de la papila genital (Figura 1).

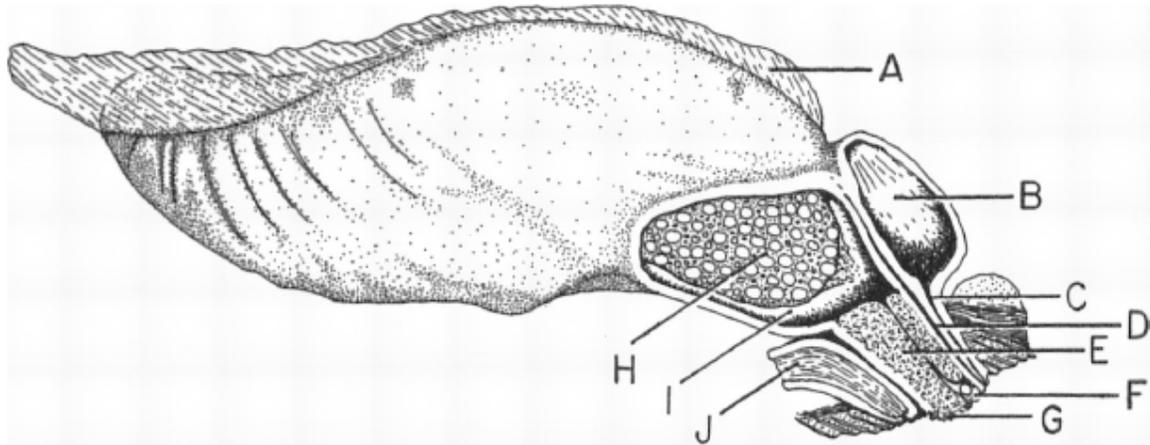


Figura 1. Vista longitudinal de una gónada de *Cephalopholis fulva* A) mesenterio; B) vejiga urinaria; C) conducto urinario; D) conducto espermático; E) contacto del oviducto; F) canal de liberación de oocitos; G) abultamiento genital; H) lámelas del ovario; I) lumen del ovario; J) recto. (Tomado de: Smith, 1965).

No presentan glándulas accesorias, como por ejemplo vesículas seminales. El tejido masculino de serránidos hermafroditas es de tipo acinoso, en el cual los espermatozoides se forman en pequeñas criptas más o menos cilíndricas (acinos), en donde todas las células de la cripta tienen la misma etapa de meiosis. Estas criptas están rodeadas por membranas de tejido conectivo las cuales se rompen cuando alcanza su madurez (Smith, 1965).

2. ANTECEDENTES

A pesar de que esta especie se ha estudiado en México por diversos autores en relación a su cultivo, durante más de 15 años, todavía falta profundizar en varios aspectos del conocimiento logrado; uno de éstos se relaciona con la formación de las gónadas durante su desarrollo embrionario, como la descripción de su ontogenia inicial (Sánchez-Gallegos, 2007), aunque esta descripción no abarca factores relacionados con su determinación sexual dada su estrategia reproductiva como hermafrodita protogínica, sería interesante conocer para su posible manipulación en la expresión fenotípica del sexo.

La cabrilla arenera, se atribuye como una especie con potencial para ser cultivada (Matus-Nivón *et al.*, 1990), aunque después de los estudios reproductivos realizados hasta la fecha y la evidencia de su complejidad reproductiva (Sadovy y Domeier, 2005), resulta necesario continuar la investigación desde el punto de vista reproductivo de la especie.

Se tiene evidencia de desoves parciales cada dos y tres días (Oda *et al.*, 1993; Lluch-Cota, 1995), y durante casi todo el año en la Bahía de La Paz (Ocampo-Cervantes, 2002). Esto representa una intensa actividad gametogénica evidenciada por el hallazgo de hembras maduras de 92 mm de longitud estándar (Hastings (1989), comprobada en las poblaciones silvestres desde los 150mm (Ochoa-Báez *et al.*, 2007), es notoria esta actividad reproductiva antes de alcanzar la talla comercial (>240 mm) (datos personales no publicados). La reproducción en tallas pequeñas, no es adecuada para fines de cultivo, debido al alto gasto energético durante la reproducción, lo cual produce un desarrollo lento (Solar *et al.*, 1984). En este contexto, se hace necesario realizar investigaciones que ayuden a identificar como controlar esta maduración precoz y proponer alternativas para resolver este problema. Para abordar esta problemática, es necesario poder discernir los factores que influyen en la determinación y diferenciación sexual de esta especie y manipularlos para controlar su reproducción.

2.1. Hermafroditismo

El hermafroditismo en peces está restringido a especies con fertilización externa y la mayoría de las especies hermafroditas son marinas. Presumiblemente la reversión sexual sucede a una edad y etapa cuando el tejido gonadal, células germinales y ductos asociados son sensitivos y responden a un balance de estrógenos y andrógenos. Esta etapa está gobernada por cambios genéticamente programados modificados por factores sociales y medioambientales (Jameson, 1988).

Los tipos de gónadas pueden clasificarse con base a su función. Los hermafroditas funcionales, al menos algunos individuos de una población, pueden madurar sexualmente en ambos sexos en su ciclo de vida. El entendimiento del desarrollo de las células germinales en hermafroditas no es claro (Sadovy y Shapiro, 1987) y tampoco es claro, el estímulo que representa la reversión sexual cuando está en reposo, previamente determinadas las células germinales del segundo sexo; o la redefinición de la determinación de las células germinales ha ocurrido. Es posible que el hermafroditismo y la reversión sexual sean regulados a nivel gonadal, con individuos que poseen una mezcla de machos y hembras de células germinales determinadas, estimuladas por la proliferación y diferenciación por condiciones diferentes.

2.2. Patrones reproductivos en la cabrilla arenera

La cabrilla arenera es un Serranido con una estrategia reproductiva compleja, su comportamiento reproductivo varia con la latitud. Este grupo de peces presenta especies gonocóricas y hermafroditismo en diferentes manifestaciones: hermafroditismo simultaneo (géneros: *Serranus*, *Diplectrum*); hermafroditismo protogínico (géneros: *Ephinephelus*, *Mycteroperca*, *Alphestes*, *Cephalopholis*) (Smith, 1965).

a) Gonocorismo en la cabrilla arenera

Para California (USA), Smith y Young (1966), hacen referencia de la cabrilla como gonocórico secundario (por derivarse de un ancestro hermafrodita) y por no

encontrar evidencia de transformaciones sexuales, aunque, estos mismos autores mencionan que la falta de evidencia, podría deberse a que el número de muestras no fueron suficientes para ver una tendencia diferente. En las bahías de New Port y Anaheim (California, USA), son reportados patrones de gonocorismo reproductivo en la cabrilla (Hovey y Allen, 2000).

b) Protoginismo en la cabrilla arenera

Para el alto Golfo de California, Hastings (1989) obtuvo una distribución de tallas en la cual encuentra que la mayoría de los ejemplares de menor tamaño son hembras y la mayoría de los individuos de mayor tamaño, son machos, aduciendo a esto un hermafroditismo protogínico. De igual forma, en la bahía de Los pulpos (Baja California, México), Hovey y Allen (2000) hacen una distribución bimodal con respecto al sexo.

En California, en estudios más recientes a diferencia de los realizados por Smith y Young (1966) en la misma área, reportan a la cabrilla arenera como protogínica (Oda *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1995).

c) Protoginismo diándrico.

En las bahías de San Diego (California, USA); Los pulpos, Baja California y Guerrero Negro, Baja California Sur, Hovey y Allen (2000) detectan la presencia de machos alfa o primarios (machos que se diferencian sexualmente en la primera madurez y permanecen de este modo durante todo su ciclo de vida), diagnóstico realizado por la presencia de lumen gonadal en el 9 % de machos, de igual forma encuentran machos secundarios (diandría).

En la Bahía de La Paz B.C.S. (México), Ocampo–Cervantes (2002), en un muestreo anual, durante el otoño encuentra ejemplares en transición sexual, como una evidencia de su condición protogínica. Aunque, también reporta la presencia de machos alfa, por lo cual hay una tendencia a un protoginismo diándrico.

d) Protoginismo poliándrico

Para el área de bahía Magdalena, Lluch-Cota (1995), también encuentra machos alfa además de hembras no transformables y protoginismo.

Así, la cabrilla arenera es un ejemplo de un complicado comportamiento reproductivo, por lo cual es importante entender y tratar de explicar algunos de los mecanismos para poder abordar estudios, particularmente los relacionados con su cultivo.

2.3. Determinación del sexo por métodos hormonales exógenos

Existen varios métodos para la masculinización, entre los más usados y eficientes se encuentra la reversión sexual mediante la administración oral de la 17 MT (17 α -metiltestosterona). Esta es la más comúnmente utilizada en especies gonocóricas como en *Pomoxis nigromaculatus* (Al-ablani y Phelps, 1997) y *Paralichthys olivaceus* (Yamamoto, 1989), con excelentes resultados. Aunque también se ha empleado con éxito en especies hermafroditas, por ejemplo; en *Dicentrarchus labrax* (Blázquez *et al.*, 1995; Chatain *et al.*, 1999). Por otra parte, en la tilapia *Oreochromis niloticus*, su reversión sexual, a partir de la producción comercial de monosexos machos (Beardmore *et al.*, 2001), es utilizada para lograr tallas comerciales uniformes (Vera Cruz y Mair, 1994).

Beardmore *et al.* (2001), mencionan con base en una revisión bibliográfica, que al aplicar el esteroide 17 MT comercial, se obtiene una alta producción de machos. Presumiblemente la reversión sexual ocurre a una edad y etapa cuando el tejido gonadal, células germinales y ductos asociados son sensitivos y responden a un balance de estrógenos y andrógenos (Jameson, 1988).

Referente al uso de esteroides exógenos, Pandian y Sheela (1995) hacen mención que de los andrógenos usados, la hormona 17 α -metiltestosterona es la que más se ha utilizado y reporta su uso para 25 especies pertenecientes a Salmonidae, Cichlidae, Cyprinidae, Anabantidae, Poeciliidae y Cyprinodontidae. Igualmente reporta entre los estrógenos más usados al estradiol-17 β , utilizado en

15 especies de los grupos; Salmonidae, Cichlidae, Cyprinidae, Anabantidae, Ictaluridae y Poeciliidae

En algunos estudios con salmones se ha demostrado que la hormona suministrada en periodos de vida inicial, es eliminada después de suspender el tratamiento (Johnstone *et al.*, 1983; Piferrer y Donaldson, 1994). Para que la reversión sexual tenga el éxito esperado, es importante considerar algunas variables, Blázquez *et al.* (2001) consideran 3 de estas: 1) tiempo de exposición con relación al desarrollo de la gónada, o tiempo de inicio; 2) la duración del tratamiento hormonal; y 3) la dosis y el tipo de esteroide usado según el sexo que se quiere invertir.

Tomándose en cuenta las variables anteriores, el punto 1, resulta ser importante y se refiere a un periodo lábil o crítico, en el cual la determinación del sexo puede ser inducida por tratamientos hormonales en larvas y juveniles de peces. De manera general, los peces indiferenciados son más sensitivos a este tipo de tratamientos (Solar *et al.*, 1984; Blázquez *et al.*, 1995; Beardmore *et al.*, 2001).

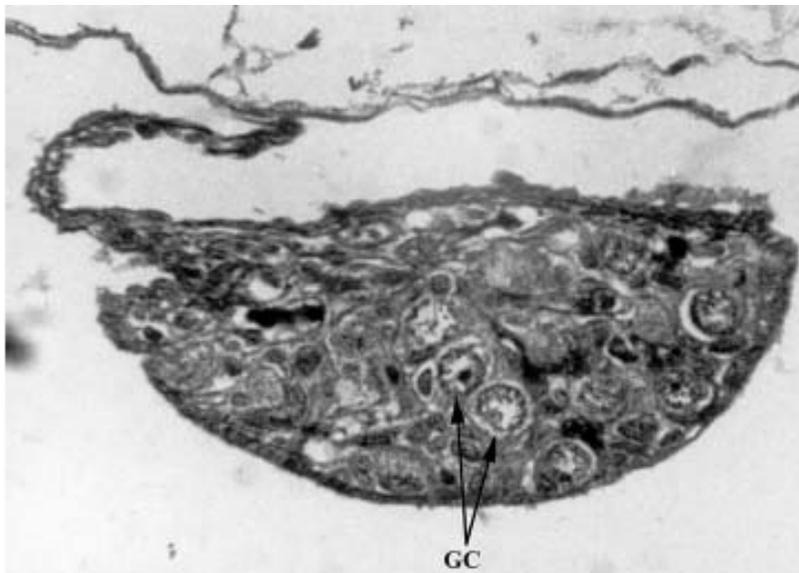


Figura 2. Corte histológico de una gónada indiferenciada de un juvenil de *Salmo trutta* de 3 meses de edad. GC) gonocito (tomado de: Dziewulska y Domagała, 2004).

En el caso de que el pez ya se ha diferenciado, puede llevarse a cabo la manipulación del sexo, pero es posible que necesite una mayor dosis y un periodo más largo del tratamiento (Piferrer, 2001).

El uso de la 17 MT tiene algunas implicaciones en el desarrollo de las gónadas, entre estas esta propiciar deformidades (*Dicentrarchus labrax* L., Chatain *et al*, 1999), o incluso la ausencia de gónadas y en algunos casos la presencia de feminización paradójica por el uso de dosis altas del esteroide (25, 50 y 100 mg/kg) (Solar *et al.*, 1984).

El periodo crítico para la reversión sexual es altamente variable según la especie; por lo general los tratamientos se aplican durante los periodos iniciales de vida observándose en particular su tipo de ontogenia (Fig. 3) (Piferrer, 2001). Por ejemplo, en salmónidos caracterizados por tener ontogenia directa, el tratamiento se inicia durante la embriogénesis. En las especies que tienen ontogenia indirecta, se inicia después de la eclosión. En *Perca fluviatilis*, al aplicar el tratamiento en individuos entre 40 y 71 mg de peso, se obtienen 100 % de machos (Rougeout *et al.*, 2002), Blázquez *et al.* (1995) en *Dicentrarchus labrax* inician los experimentos con hormonas antes de la diferenciación sexual, lo que sucede 100 días después de la eclosión.

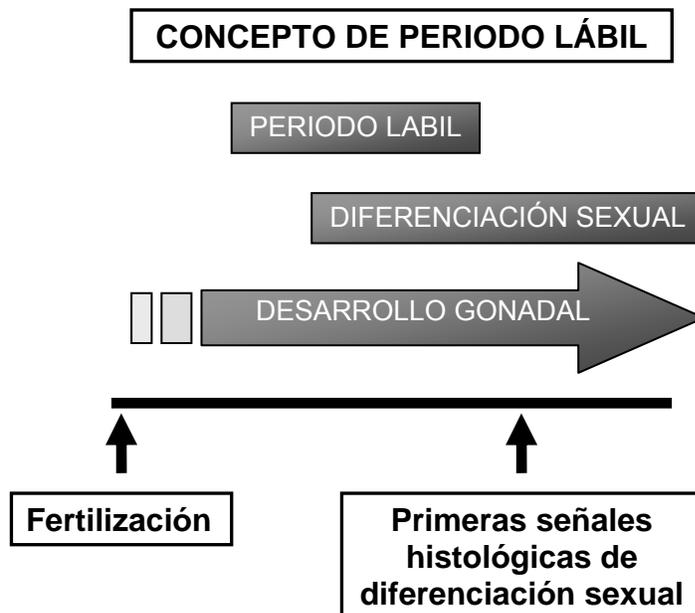


Figura 3. Se muestra el periodo lábil, este varía dependiendo de la especie y puede ocurrir desde la fertilización hasta que ocurran las primeras señales de diferenciación sexual (tomado de: Piferrer, 2001).

Existen diversos estudios en donde se señalan los tiempos en que se da este proceso y se puede apreciar la variabilidad con el tiempo en que presenta para diferentes especies. En un resumen de la labilidad con respecto a la determinación del sexo se hace la siguiente clasificación (Oldfield, 2005)

- a) Labilidad durante la etapa larval: determinación del sexo por factores ambientales.
- b) Labilidad en la etapa juvenil: determinación del sexo por control social.
- c) Labilidad en la etapa de adulto: hermafroditismo secuencial

Por lo tanto, es importante detectar cuando se presenta la diferenciación para la especie en estudio.

2.4. Alteraciones en el mecanismo de la determinación sexual

Para entender la manera o algunos de los mecanismos en que ocurre la diferenciación sexual, es importante detectar la expresión de la P450 aromatasa, enzima responsable de la conversión de andrógenos en estrógenos. En términos generales, la presencia de esta nos puede indicar que se está diferenciando sexualmente hacia hembras, ya que estaría activamente transformando estas hormonas y la presencia de esta enzima ocurriría en hembras (Kitano *et al.*, 1999) Es importante mencionar los hallazgos con relación a la expresión de la aromatasa. Esta enzima juega un papel importante en el desarrollo de la gónada, particularmente durante la diferenciación sexual. Kroon *et al.* (2005), discuten la importancia de esta enzima como una clave para la diferenciación sexual funcional y Kitano *et al.* (1999), reportan para *Paralichthys olivaceus*, la obtención de machos fenotípicos al suprimir la acción de la P450 aromatasa.

La manipulación de la diferenciación sexual, tiene su fundamento en la acción de la enzima aromatasa. Esta se forma a partir del colesterol y es la enzima responsable de convertir andrógenos en estrógenos (González-Cabeza, 2003).

Baroiller y Cotta (2001) hacen alusión a la plasticidad durante la diferenciación sexual y que la gónada puede ser orientada hacia uno u otro sexo, sin embargo un

cambio en el balance de esteroides puede cambiar la ruta de la diferenciación (Figura 4).

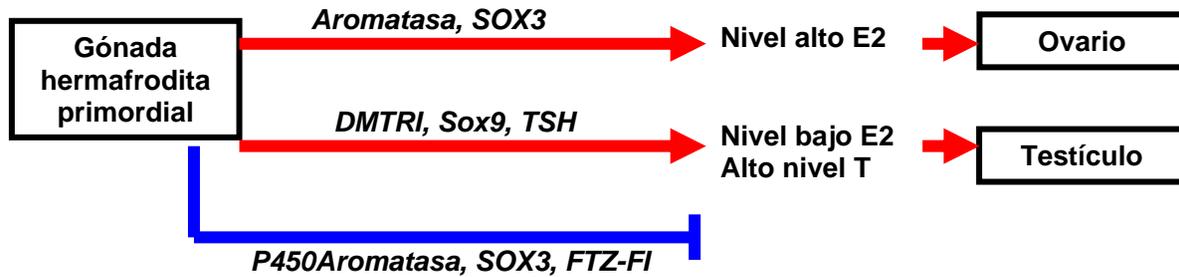


Figura 4. Modelo hipotético de los mecanismos moleculares durante el cambio de sexo en serranidos hermafroditas. ⊥ inhibición, ↓ activación (Tomado de Zhou y Giu, 2008).

La biosíntesis de estrógenos está catalizada por el citocromo 450 aromatasa (Figura 5), catalíticamente activo y unido a una flavoproteína reductasa, que facilita el flujo de electrones para su oxidación (González-Cabeza, 2003).

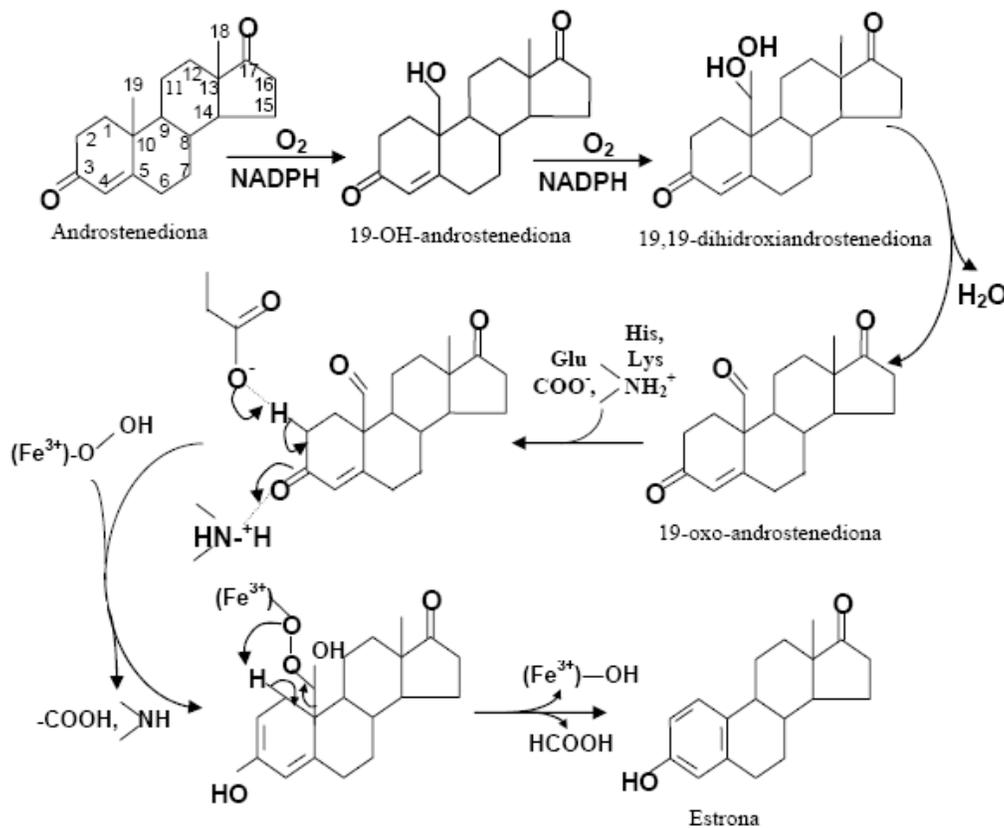


Figura 5. Esquema de aromatización, se transforma en estrona, ácido fórmico y agua. Modificado de Simpson *et al.*, 2002.

El genoma de zebrafish contiene dos genes de aromatasa designados como cyp 19a y cyp 19b. El gen cyp 19a esta expresado en la capa celular esteroideogénica de la teca y la granulosa que rodea los oocitos en el ovario, mientras el gen cyp 19b esta expresado principalmente en el cerebro. De esta manera, mientras un gen aromatasa está involucrado en el desarrollo gonadal, el otro gen participa en el desarrollo neuronal. Aunque, los dos genes contribuyen en la regulación de las respuestas estrogénicas y así influenciar en la diferenciación sexual (Hofsten y Olsson, 2005).

2.5. Eje cerebro-hipófisis-gónada

Si bien se han hecho algunos adelantos en las últimas décadas en los mecanismos de la determinación sexual no están bien conocidos todavía, y se sabe de la importancia del eje cerebro-hipófisis-gónada. Este sistema consiste de tres componentes conectados en su fisiología. Las neuronas neuroendocrinas en la región preóptica del cerebro, forman una interface entre el sistema nervioso central y el sistema endocrino. De estas hormonas emergen inhibidores y estimuladores, que producen hormonas liberadoras de gonadotropinas (Gnr, por sus siglas en ingles). En los teleósteos, las neuronas de la GnRH están inervadas directamente a las células productoras de gonadotropinas (gonadotropas) en la pituitaria, la estimulación, producción y liberación de dos gonadotropinas químicamente relacionadas (GtHs), la hormona folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH) son liberadas en la circulación; estimulan las gónada por unión con los receptores específicos de la membrana. Las gónadas producen células germinales durante la espermatogénesis, también esteroides sexuales, y factores de crecimiento importantes para la regulación de la reproducción, directamente en el tejido gonadal en un mecanismo paracrino o autocrino de retroalimentación positivo o negativo sobre la pituitaria y el hipotálamo en una reacción endocrina Weltzien *et al.* (2004) (Figura 6).

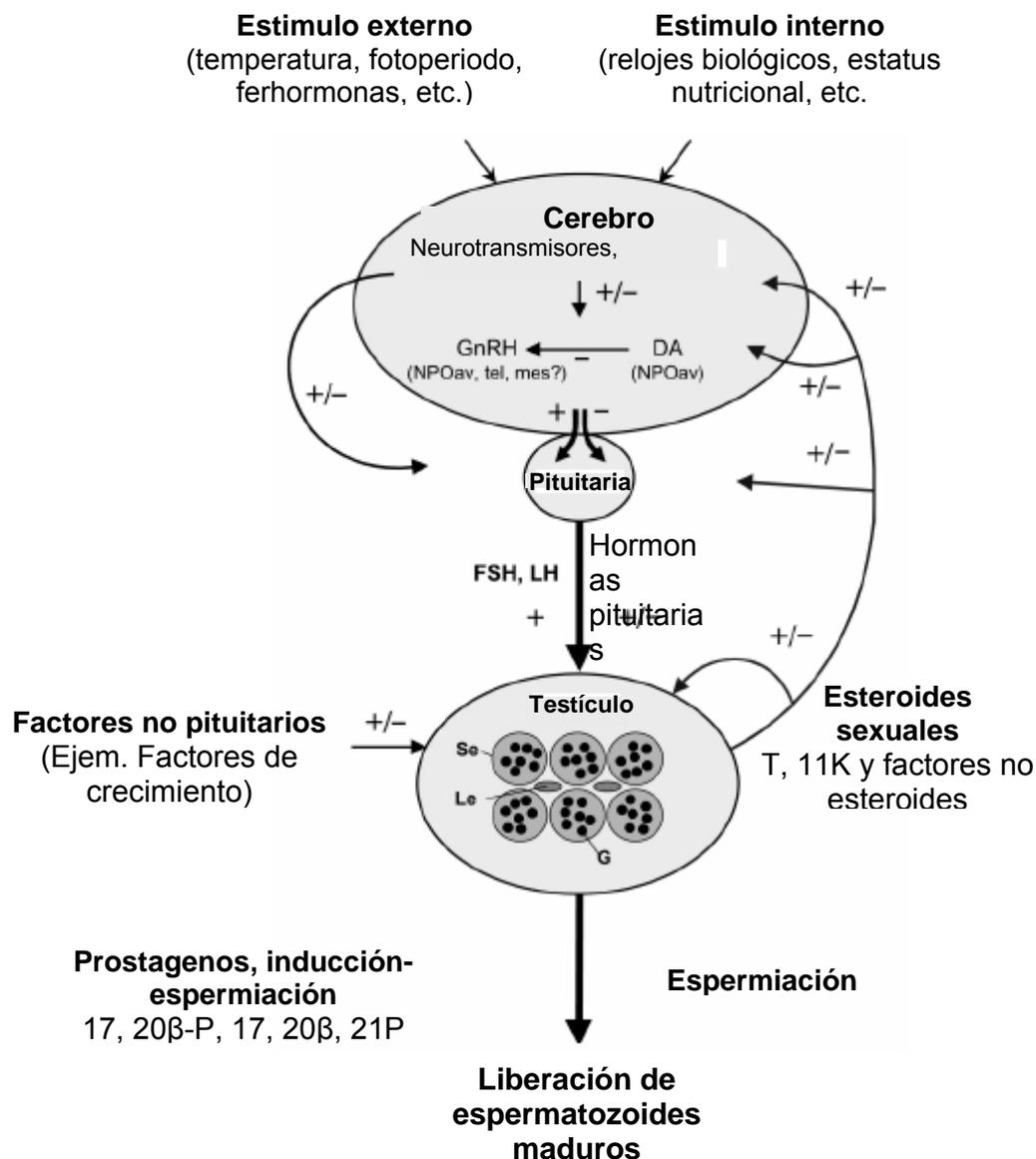


Figura 6. Eje cerebro-hipófisis-gónada en teleósteos machos (Tomado de Weltzien *et al.*, 2004).

2.6. Cultivo de la cabrilla arenera

Con referencia a la reproducción en condiciones de cultivo, se sabe que bajo un régimen foto-térmico (13:11, luz-oscuridad y T° C 23, respectivamente (Rosales-Velázquez *et al.*, 1992) y alimentación con juveniles de pescado fresco es posible obtener desoves voluntarios durante todo el año. Esta característica presenta a la cabrilla arenera como una especie con potencial para ser cultivada, ya que

además se tiene establecido un protocolo de larvicultivo (Álvarez-González, 1999; García-Gómez, 2003), preengorda y engorda a la talla comercial (Tanos-Grayeb, 2001).

Si se considera que el control de la reproducción es el primer paso, el siguiente paso es la producción de crías viables de ser cultivadas. Esto debido a que durante el larvicultivo, se reportan las mortalidades más altas, que en el mejor de los casos, para la cabrilla arenera se reporta una supervivencia del 11 % (Alvarez-González, 1999). Dentro de las prácticas que se buscan para incrementar esta supervivencia, se encuentra la incorporación temprana del alimento inerte (García-Gómez, 2007), que además reduciría el alto costo que se presenta en conjunto lo que conlleva la producción del alimento vivo (50 % del costo total de producción).

El presente estudio pretende inducir experimentalmente la masculinización de la cabrilla arenera por medio de la acción del andrógeno 17 α -metiltestosterona, una vez que se haya finalizado la coalimentación del alimento vivo con el alimento inerte (30 días después de la eclosión, DDE) y hasta 120 DDE. Así mismo pretende evaluar el crecimiento por 300 DDE y la viabilidad del mismo para contribuir con esta información para argumentar su potencial con fines de cultivo.

3. HIPÓTESIS

El esteroide 17 α -metiltestosterona (17 MT), suministrado a través del alimento inerte, afectará el desarrollo gonadal durante la diferenciación sexual de *Paralabrax maculatofasciatus*, provocando la masculinización de los individuos sometidos a diferentes dosis y tiempos, así mismo, incrementará el crecimiento en peso y longitud. Disminuirá la expresión de la enzima aromatasa al finalizar la masculinización.

4. JUSTIFICACIÓN

En la cabrilla arenera, se han realizado trabajos de manera extensiva, acerca de la reproducción en cautiverio y de su larvicultivo, sin embargo, estos estudios se restringen a lo concerniente al periodo juvenil de esta especie.

Es precisamente en este periodo juvenil, donde se dan cambios importantes en cuanto a la diferenciación sexual, cambios que considerando la condición de hermafrodita protogínica, van a interferir en la expresión fenotípica del sexo de esta especie, cuando en alusión a su protoginismo, es de esperarse primero su diferenciación como hembras. A este respecto, es sabido que considerando la plasticidad que tienen los peces para cambiar de sexo, la expresión fenotípica de este puede ser manipulada.

El control en la determinación sexual, es importante, considerando que para fines experimentales, pueda resultar conveniente el piscicultivo en el cual se vea favorecido un sexo en particular. Esto, sobre todo como una forma de control en especies de las cuales se sabe que son precoces en su reproducción, tal es el caso de la cabrilla arenera.

La cabrilla arenera posiblemente no sea el mejor candidato en México para realizar su cultivo; no obstante sin duda, es la especie con mas conocimiento aportado para el desarrollo de la piscicultura marina en México.

Aún existen numerosas incógnitas que resolver para que el cultivo de peces marinos en México sea una realidad, sobre todo de una biotecnología desarrollada al interior, la cual no se contrapone con la importación de biotecnologías, pero estas en la mayoría de los casos, requieren de adaptaciones que no siempre son favorables debido a la complejidad y retos que representa cada especie.

El presente trabajo, contribuye al desarrollo métodos del cultivo de peces marinos en México, por incidir en la importancia de controlar la manifestación fenotípica del sexo. Este control, es sabido en otras especies, puede favorecer el desarrollo somático, relevante para fines de cultivo. De manera particular, es importante en especies con actividad reproductiva precoz, debido a que conlleva un gasto energético que no favorece el crecimiento.

El presente documento trata algunos supuestos y expectativas, sin embargo, por ser el primero de este tipo realizado en esta especie, las expectativas podrían ser aun mayores, debido a que no se descartan la obtención de resultados no previstos en el diseño del experimento.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Inducir a la diferenciación sexual de una población de juveniles *P. maculatofasciatus*, en condiciones experimentales, e inhibir la reproducción mediante el suministro del esteroide 17 α -metiltestosterona (17 MT).

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el periodo lábil en que sucede la presencia de células germinativas y la diferenciación sexual en juveniles.

Evaluar los efectos producidos por la 17 α -metiltestosterona, suministrada a través del alimento inerte en tres dosis (15, 30 y 60 mg/kg) y tres tiempos (30, 60 y 90 días), sobre:

- El desarrollo gonadal durante la diferenciación sexual hacia el sexo masculino.
- El crecimiento de los juveniles durante y después del suministro del esteroide.
- La expresión de la enzima aromatasa durante la masculinización.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Identificación del período lábil de la cabrilla arenera

Para iniciar los tratamientos con la 17 MT es necesario que las gónadas estén indiferenciadas o en período de formación (células germinales, primordios gonadales, gonias). Para lo anterior, se estimó el momento en que deben ser administrados los tratamientos propuestos. Previamente se realizaron análisis histológicos de muestras de larvas de la cabrilla arenera obtenidas en experimentos anteriores. Se analizaron larvas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 DDE. Las larvas se pesaron con ayuda de una balanza analítica marca Sartorius con una precisión de 1×10^{-4} y con papel secante para evitar el exceso de humedad.

Por otra parte, debido a que no se disponía de muestras posteriores al día 30 DE, se realizaron colectas de campo, utilizándose un chinchorro charalero de 20 m de largo por 1.5 m de alto y luz de malla de 0.5 cm. Se pesaron y midieron cada una, según lo descrito anteriormente y de igual modo se fijaron en formol al 10 % tamponado con fosfatos (pH 7).

Las muestras se procesaron por técnicas de inclusión en parafina: se tomó una porción central en la parte media del cuerpo, lavándose cuidadosamente con agua corriente para eliminar el exceso del fijador y posteriormente se procedió a la deshidratación con alcohol etílico en concentraciones crecientes (80°, 96° y 100°) y una solución 1:1 de alcohol absoluto:americlear. Se impregnaron en parafina a 56° C (pF), y se llevaron a su inclusión definitiva con parafina a 60° C (pF). Los cortes se tiñeron con la técnica tricrómica de Mallory para así poder detectar la presencia de gonias y en lo posible células germinales y en su caso, con respecto a los juveniles de campo, diagnosticar el sexo.

Mediante un digitalizador de imágenes acoplado a una computadora se realizó el seguimiento histológico del desarrollo de las gónadas de los juveniles de cabrilla arenera sacrificados cada semana. El análisis fue determinado en base a los criterios propuestos para peces Serranidos por Smith (1965), así tenemos las siguientes etapas para el desarrollo de los oocitos (Figura 7):

Etapa-1.- Oocitos pequeños (12-30 μm de diámetro), con una delgada capa de citoplasma basófilo, rodeando un gran núcleo (este núcleo es simple).

Etapa-2.- Oocitos más grandes (20-125 μm), tienen un citoplasma oscuro y muchos nucléolos periféricos en el núcleo.

Etapa-3.- Oocitos (90-250 μm) tienen un citoplasma ligeramente basófilo, en el cual las vesículas vitelinas tienen un desarrollo gradual. Al finalizar la etapa 3, la zona radiata empieza a aparecer.

Etapa-4.- Oocitos (375-500 μm) tienen una delgada zona radiata y están presentes las vesículas vitelinas y glóbulos de vitelo. Hay una prominente presencia de cromosomas localizados en la vesícula germinal.



Figura 7. Gónada de *Cephalopholis fulva*, se muestran las etapas 1, 2, 3 y 4 del desarrollo del oocito (tomado de Smith, 1965).

En cuanto a la designación de etapas para el tejido ovárico, Smith (1965) propuso la siguiente clasificación:

Ovario inmaduro.- Las etapas 1 y 2 del desarrollo de los oocitos están presentes, no hay cuerpos atrésicos.

Ovario maduro inactivo.- Etapas 1, 2 y 3 del desarrollo del oocito, hay la presencia de cuerpos atrésicos (indican que hubo desove).

Ovario maduro activo.- Están presentes las etapas 1, 2, 3 y 4 del desarrollo del oocito, hay presencia de folículos vacíos (indican la ocurrencia actual de desoves).

Ovario post-desove.- Tiene folículos vacíos (con o sin capas granulosas hipertrofiadas), también hay oocitos degenerados en etapa 4.

Con relación al diagnóstico del desarrollo de la gónada masculina, Smith (1965) establece los siguientes criterios:

Testículo inmaduro.- El tejido consiste de grupos de células no organizadas dentro de criptas distinguibles.

Testículo maduro inactivo.- Criptas bien organizadas, algunas contienen esperma maduro, otras con espermatoцитos primarios y secundarios.

Testículos en maduración.- Presencia de meiosis, espermatoцитos primarios y secundarios, relativamente poco esperma maduro.

Testículos maduros.- La mayoría de las criptas están llenas con esperma, pocas etapas de espermatoцитos tempranos.

Testículos post-desove.- Escaso esperma, pocos espermatoцитos primarios y secundarios. Los testículos están dominados por espermatogonias y tejido conectivo.

Gónada ovotestis en transición.- Permanecen etapas 1, 2, 3 y 4 de oocitos, presencia de cuerpos atrésicos, proliferación de criptas seminíferas en el epitelio germina (la gónada tiene criptas completamente formadas y aún pueden permanecer remanentes de oocitos) (Figura 8).

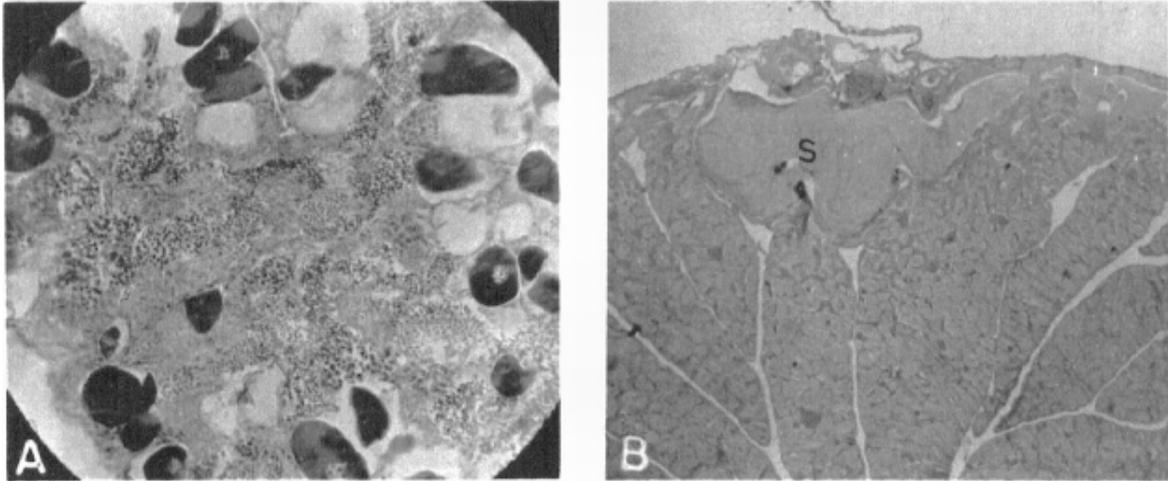


Figura 8. Gónada de *Cephalopholis fulva*, A) Gónada recientemente transformada con remanentes de oocitos etapa 2; B) Macho con sinus (s) espermático lleno de esperma (tomado de Smith, 1965).

Con estos criterios se logró diferenciar la longitud en la cual se tiene la presencia de células germinales y la longitud en la cual se diferencian sexualmente, lo que está comprendido como período lábil.

6. 2. Captura y acondicionamiento de reproductores.

Entre el 2 y 3 de febrero del 2007 se efectuó la captura de 90 peces adultos de cabrilla arenera. La pesca se realizó en la zona conocida como “las pacas”, en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, entre los 21.18° y 24.2° de latitud Norte y los 110.43° y 110.41° de longitud Oeste (Figura 9). Los peces se pescaron por medio de línea y anzuelo, se utilizó calamar como carnada.

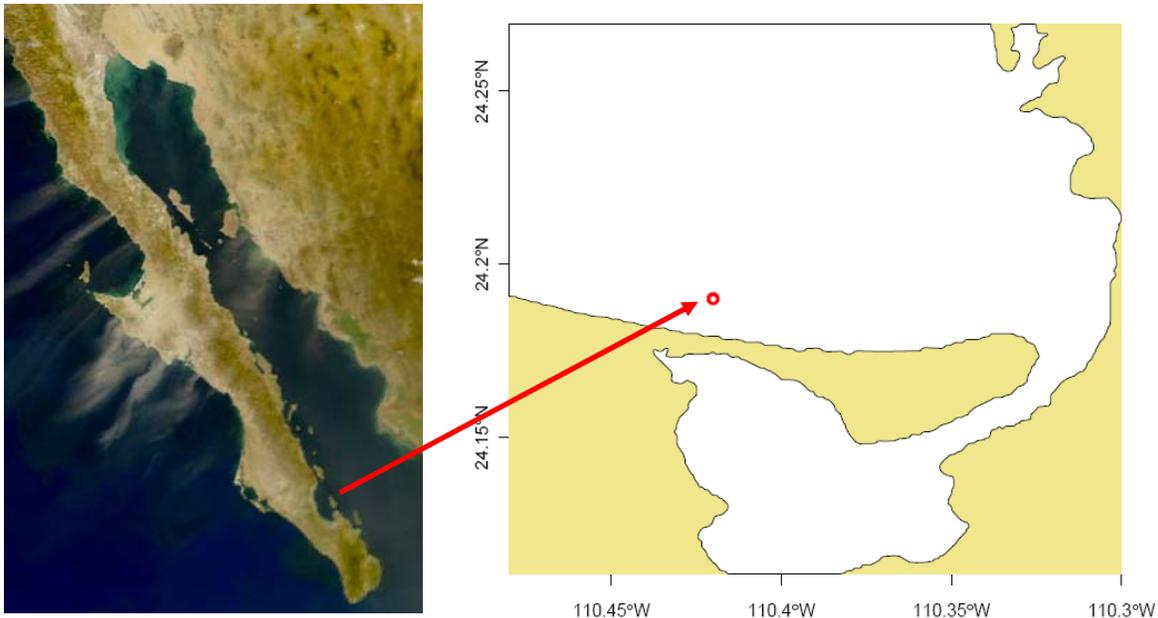


Figura 9. Área de captura de los reproductores de la cabrilla arenera, localidad “las pacas”.

Los ejemplares capturados fueron transportados vivos, en un vivero cúbico de fibra de vidrio con capacidad de 100 l, dentro de una embarcación de 8 m de eslora, con motor fuera de borda de 130 HP y posteriormente se llevaron al laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN. El trayecto de transporte hasta el laboratorio duró aproximadamente 30 minutos a una velocidad de 6-8 nudos. Se introdujeron en el Sistema Cerrado de Inducción al Desove (SCID) (Fig. 10) (Martinez-Brown, 2007). Después de un período de aclimatación y cuarentena de 21 días, se seleccionó un lote de 60 reproductores. Durante este período se mantuvo una temperatura constante de 22 °C y un fotoperíodo de 13:11 horas (luz:oscuridad), el cual empezó a las 6:30 y finalizó a las 19:30 h.



Figura 10. Sistema cerrado de inducción al desove (SCID), lugar donde se mantuvieron los reproductores de cabrilla y de los cuales se obtuvo el desove para iniciar el experimento.

Los reproductores con un peso y talla promedio de 300 g y 24 cm de longitud patrón (LP), para los machos y 250 g y 20 cm (LP) para las hembras (respectivamente), fueron colocados en proporción de 3:2 (hembras:machos) en un mismo tanque tipo cilíndrico, con un volumen de 1,100 l (Figura 8). Diariamente fueron alimentados con pescado fresco (juveniles de mojarra; género *Eucinostomus*). La mojarra recién capturada fue lavada con agua dulce y congelada por al menos un día previo a ser utilizadas para alimentar a los reproductores; este alimento fue suministrado una vez al día a saciedad, entre las 10 y 11 de la mañana. Después de una semana, el alimento congelado no se suministró, desechándose el sobrante (Rosales-Velázquez, 1997).

En las condiciones antes mencionadas, después de haberse colocado los reproductores en la proporción de sexos de 3:2; después de 5 días se obtuvieron huevos fecundados. Tres semanas después, la producción de alimento vivo disponible, en las densidades y escalas de producción adecuadas estuvo se obtuvo un desove de 80 ml de huevos fecundados; destinándose a siembra para iniciar el experimento.

La tasa de eclosión se evaluó a las 24 h después del desove y se determinó por medio de la relación (Carrillo *et al.*, 2000):

$$TE = [(EI)(100)]/Em$$

en donde: TE = Tasa de eclosión
EI = Número de eleuteroembriones
Em = Número de embriones sembrados

La tasa de supervivencia larvaria se evaluó a partir de la absorción del vitelo, a las 72 h y se calculó con la siguiente fórmula:

$$SL = [(Lv)(100)]/Lt$$

en donde: SL = Tasa de transición larvaria
Lv = Número de larvas vivas
Lt = Número total de larvas (vivas + muertas).

La tasa de supervivencia larvaria a la inanición se determinó después de determinar la sobrevivencia larvaria cada 24h, hasta que todas las larvas murieron por el efecto de la inanición y se calculó con la siguiente fórmula, para cada momento de determinación:

$$Si = [(Lv)(100)]/Em$$

en donde: Si = tasa de supervivencia de larvas a la inanición
Lv = Número de larvas vivas
Em = Número de embriones sembrados

6. 3. Cría larvaria de la cabrilla arenera

La siembra de los huevos de *P. maculatofasciatus* se llevó a cabo en un sistema cerrado (SC-18); consistente de 18 tanques cúbicos de fibra de vidrio con capacidad de 140 l c/u, con paredes y fondo de color gris claro; un filtro biológico marca Sea Storm, calentadores sumergibles marca Aqua Clear individuales (uno por tanque), un espumador de albúminas marca Euroreef con una bomba sumergible marca Sedra modelo KSP 5000, una bomba de recirculación marca PerformancePro serie Artesian con potencia de 1/8 HP, un sistema de luz UV de cuatro focos (50 watts c/u) marca Tropical Marine Centre modelo PM4, un filtro mecánico de arena (200 µm) marca PAC-FAB modelo Triton II (Pentair Inc., Goleen Valley, Minnesota, EUA) y un reservorio de agua de fibra de vidrio de forma cilíndrica de 700 l de capacidad (ubicado en la Unidad Piloto de Maricultivos del CICIMAR-IPN, Figura 11) (Sánchez-Gallegos, 2007).



Figura 11. Sistema Cerrado de 18 tanques (SC-18).

La siembra se realizó a partir de un desove de 80 ml, obtenido de los reproductores de la cabrilla mantenidos en el SCID. Se usaron 3.4 mL (aproximadamente 6,000 huevecillos) para sembrarlos directamente en cada uno de los tanques del SC-18.

Durante el primer día después de la eclosión (DE) a las larvas se le suministro como alimento rotíferos sin enriquecer (Figura 12), a una densidad de 20 Rot/larva. A partir del día 2 (DE), los rotíferos se enriquecieron con una emulsión

comercial EASY SUPER SELCO[®], en las concentraciones recomendadas por el proveedor (INVE Aquaculture; Derdenmonde, Bélgica) y con una densidad de 200 Rot/larva. La alimentación se administró 3 veces al día con un intervalo de 4 horas entre cada una, iniciándose a las 10:00 a. m.

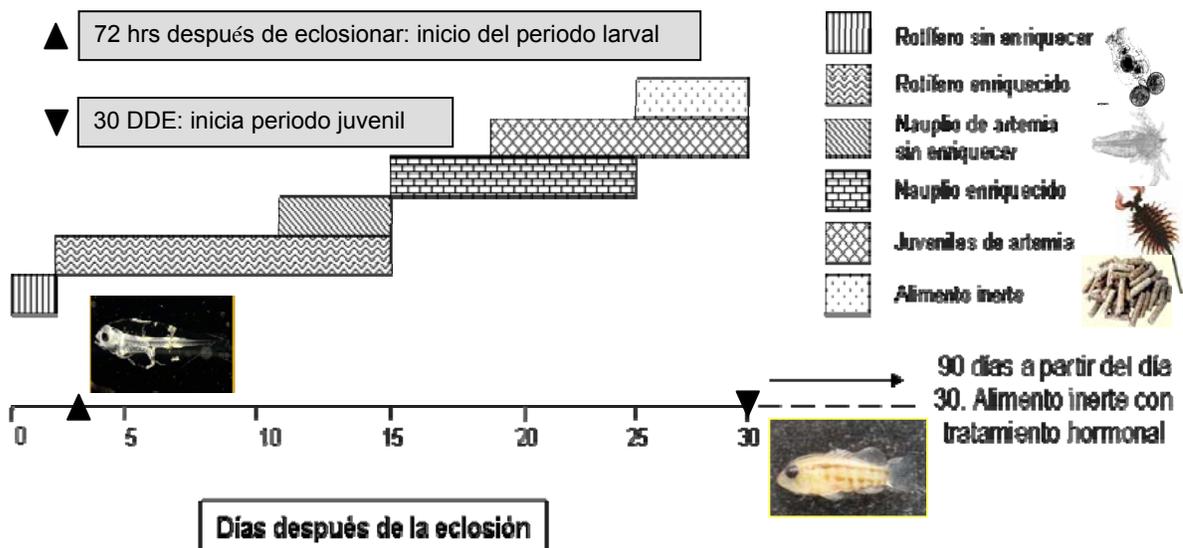


Figura 12. Protocolo de alimentación de larvas de cabrilla arenera.

Al inicio del experimento los tanques fueron llenados hasta 100 l y al día 3 DE se sifoneó el fondo utilizándose un tubo de vidrio y manguera de acuario; en el séptimo día se elevaron a su nivel máximo (140 l). La circulación parcial, flujo de agua, la inyección de aire y los recambios parciales de agua del reservorio de almacenamiento del sistema comenzaron a partir del día 7 DE (según lo propuesto por Alvarez-González, 1999)

Se realizó el monitoreo diario de las siguientes variables ambientales: la salinidad (35.8 ± 1.1 ‰), la temperatura (25.1 ± 1.1 °C) y el oxígeno disuelto (6.4 ± 0.3 mg/l); los registros se hicieron por medio de un aparato multiparámetro de campo marca YSI modelo 85 (Yellow Springs, Ohio, USA). El amonio total (0.2 ± 0.1 ppm) y el nitrito total (0.02 ± 0.01 ppm) a través de métodos espectrofotométricos (Strickland y Parsons, 1972), utilizándose un espectrofotómetro marca Spectronic modelo Genesys 2.

Al día 8 DE, comenzó parcialmente la circulación del agua con un flujo de 50 cm³/min, se colocaron filtros con malla de 200 µm insertados en los tubos intermedios de los tanques (estos permiten el drenado del agua por rebosamiento). Estos filtros impiden el paso de las larvas pero, facilitan el paso del agua y de partículas menores a 200 µm

Desde la primera alimentación (10 a.m.) y dos horas después de la última alimentación (8 p.m.), la circulación del agua se detuvo para favorecer la disponibilidad del alimento vivo. Entre las 8 p.m. y las 10 a.m. se abrían las llaves para reiniciar la circulación del agua.

Del día 2 al 4 (DE), se mantuvo la densidad de 200 Rot/larva y se incrementó a 280 Rot/larva desde el día 5 al día 11 (DE). Desde el día 11 DE, se inició una coalimentación con nauplios de *Artemia* (Neptuno Industries, Salt Lake City Utha, EUA), con una densidad de 400 Naup/larva de la *Artemia* suministrada. Durante la coalimentación se sustituyeron las cantidades suministrados de rotíferos y *Artemia* en la siguientes proporciones: 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 (rotíferos:*Artemia*). Al día 16 DE, solo se administraron nauplios de *Artemia*, complementándose con juveniles de *Artemia* a partir del día 18 DE. Esto permaneció hasta el día 25 DE, momento en que inició la coalimentación con el alimento inerte (200-500 µm Lansy CW, marca INVE, Dendermonden, Bélgica, tabla 1).

Tabla 1. Análisis químico reportado por el fabricante del alimento comercial Lansy CW™, utilizado durante el primer mes de los experimentos, enriquecido con 17 MT.

Humedad	7%	Vit. A	30,000 IU/kg
Proteína	58%	Vit. D3	2,500 IU/kg
Lípidos	15%	Vit. E	700 mg/kg
Cenizas	12%	Vit. C	2,000 mg/kg
Fibra	1%	Sum _ω 3 HUFA	30 mg/g dwt
Fósforo	1.7%	DHA/EPA	2
Quelatos de cobre de aminoácidos hidratados	10% Cu:		5 mg/kg
Antioxidantes		BHT/Etoxiquina/Propilgalato	

De este modo, la proporción de alimento sustituido fue de 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, y se finalizó con el 100 % de alimento inerte al día 30 DE. A partir de este día, se iniciaron los tratamientos con la 17 MT.

En el día 30 DE se incrementó el flujo del agua de $200 \text{ cm}^3/\text{min}$ a $800 \text{ cm}^3/\text{min}$, cambiándose de un flujo superficial a un flujo vertical, modificándose también la orientación de la posición del tubo de suministro de agua de cada tanque. Para el día 40 DE, el flujo de agua permaneció abierto permanentemente, incluso durante el suministro de alimento.

6.4. Diferenciación de células germinales en juveniles de cabrilla arenera

Antes de empezar los ensayos con la 17 MT, al cumplir 30 DDE, se tomaron muestras de peces para corroborar la presencia de gonias o células germinativas. Se sacrificaron un total de 15 individuos, estos se midieron y pesaron para su posterior análisis histológico. Así mismo, esta muestra marcó el inicio de la experimentación con los tratamientos hormonales propuestos, dando a conocer el estado estructural gonadal que mantenían antes de iniciar la alimentación oral con la 17 MT.

Además, en términos generales, se verificó el período de desarrollo correspondiente, esto se pudo lograr considerando los criterios de Ortiz-Galindo *et al.* (1995) para ejemplares de la cabrilla arenera, en el cual compara el conteo de elementos de larvas y juveniles con respecto al de adultos.

Los ejemplares sacrificados se fijaron en formol al 10 % con fosfatos (pH 7). Después de iniciados los tratamientos, se tomaron cada semana 3 individuos por tratamiento durante 11 semanas, para así poder hacer un seguimiento en cuanto a la talla en que se diferencian sexualmente y para observar el proceso de masculinización.

Si se toma en cuenta que una de las variables fue el tiempo de administración de la 17 MT y que la evaluación fue cada mes, al finalizar 30 DDE, se sacrificaron 15 individuos por tratamiento. Este procedimiento permitió estimar el porcentaje de masculinización por mes, con el fin de determinar el tiempo y dosis de administración más efectivos.

Los juveniles de cabrilla fueron tomados al azar y colocados en un recipiente de 1 Lt hasta el momento de sacrificarlos. Después se secaron con un papel absorbente para extraer el exceso de humedad y se procedió a realizar la biometría correspondiente.

Los peces se midieron y pesaron con un Vernier 0.001 mm (VWR, Modelo: 62379-531) y una balanza Ohaus adventure con 0.01 de precisión. Se tomo la longitud patrón (LP) y el peso del pez.

Después de la biometría los especímenes se colocaron en una charola de disección para seccionarlos extrayendo un segmento transversal comprendido del

ano hasta el inicio de las aletas pectorales (Fig. 13). Este segmento se fijó en formol tamponado con fosfatos, esta operación se llevó a cabo durante los muestreos de las 4 primeras semanas de tratamientos (30-60 DDE). Las fijaciones posteriores fueron realizadas con mezcla de Davison, debido a que las estructuras óseas tenían un mayor desarrollo (tamaño) y presentaban más resistencia al realizar los cortes en el micrótopo. El fijador Davison, debido al ácido acético que contiene en su formulación, ayuda a degradar el tejido óseo teniendo las previsiones adecuadas, ya que más de 3 días en este fijador degrada el resto de los tejidos. Después de esto, los segmentos fijados en Davison se pasaron a alcohol absoluto.

Las muestras se procesaron por técnicas de inclusión en parafina (como se describió anteriormente).

Se realizaron cortes seriados de 3 μm y se tiñeron con la técnica hematoxilina-eosina (Humason, 1979). Se procedió a la observación al microscopio óptico con el fin de ubicar la gónada y lograr determinar el sexo en los juveniles de cabrilla, identificar el sexo, se describió el estado de desarrollo que presentaba la gónada en ese tiempo, según lo reportado por Smith (1965).

6. 5. Enriquecimiento del alimento inerte con la 17 MT

Como primer punto, se preparó una solución madre de la 17 MT a una concentración de 5 g/l disueltos en etanol al 70 % según lo propuesto por Popma y Green (1990).

Si se considera que en cada mililitro de la solución hay 5 mg de hormona, se hicieron los cálculos para las concentraciones de 15, 30 y 60 mg/kg.

Así, para preparar los alimentos con las concentraciones requeridas se usó la siguiente relación:

Concentración requerida (mg/kg)	Solución madre (17 MT)
15	3 ml
30	6 ml
60	12 ml

De manera práctica, se preparó el alimento cada 20 días, de acuerdo con lo propuesto por Popma y Green (1990), la 17 MT se incorporó al alimento inerte de la siguiente manera: se pesó de manera independiente cada ración de alimento para cada tratamiento; en una charola de plástico se extendió el alimento esparciéndolo de manera regular hasta tener un espesor de aproximadamente 0.5 cm.

De acuerdo al peso del alimento y considerando la relación anterior, se determinó el volumen de 17 MT. Para lograr la incorporación del esteroide en la totalidad del alimento, se agregó un volumen mayor de alcohol etílico para asegurar que la hormona quedara impregnada totalmente en el alimento esparcido, vertiendo el esteroide disuelto en el alcohol, por medio de una pipeta de vidrio de 10 ml, se repitió la operación hasta terminar de verter el volumen designado. Un ejemplo de la disolución para 15 mg/kg, se presenta de la siguiente manera;

Cantidad de alimento	Concentración de 17 MT	Volumen de 17 MT	Volumen de Alcohol etílico
400 g	15 mg/kg	1.2 ml	50 ml

Se incorporó la 17 MT en el alimento inerte con el volumen de alcohol etílico correspondiente, se mezcló con una espátula hasta que la totalidad del alimento estuviera húmedo (así se garantizó que la 17 MT se adhiriera a todo el alimento). Se repitió la operación de mezclar el alimento al menos 3 veces con el fin de ayudar a que el alcohol se evaporara adecuadamente. Esta actividad se realizó durante la noche para evitar en lo posible la luz artificial y principalmente la luz Solar. Una vez mezclado el alimento, se dejó secar a temperatura ambiente durante el resto de la noche, por aproximadamente 12 horas. Después de este tiempo el alimento se conservó en bolsas y dentro de un recipiente de plástico oscuro de sellado hermético en refrigeración a 10 °C.

Para el caso del alimento control, se procedió de la misma manera, exceptuando agregar la hormona.

6.6. Juveniles de cabrilla arenera sometidos a tratamientos con 17 MT

A partir del día 30 DE, se dio inicio a los tratamientos con 17 MT, de acuerdo con el siguiente diseño experimental (Tabla 2):

Tabla 2. Diseño experimental para determinar la dosis y tiempo de aplicación del esteroide 17 MT en juveniles de cabrilla arenera.

Dosis de MT	Tiempo de exposición (días)	Réplicas			Tratamientos
0 mg/kg +	30	R1	R2	R3	T1
	60	R1	R2	R3	T2
	90	R1	R2	R3	T3
15 mg/kg	30	R1	R2	R3	T4
	60	R1	R2	R3	T5
	90	R1	R2	R3	T6
30 mg/kg	30	R1	R2	R3	T7
	60	R1	R2	R3	T8
	90	R1	R2	R3	T9
60 mg/kg	30	R1	R2	R3	T10
	60	R1	R2	R3	T11
	90	R1	R2	R3	T12

+ TESTIGO (sin 17 MT)

Los peces destinados para la experimentación fueron concentrados y contabilizados en un tanque rectangular de 200 l. Se designaron tres replicas (70 peces por replica), cada una con un total de 210 peces por tratamiento.

Desde este momento, los juveniles de cabrilla arenera fueron seleccionados al azar y se repartieron en 12 tanques del sistema SC-18. La distribución de los tratamientos en los tanques fue asignada por una tabla de números aleatorios.

La alimentación se realizó en los mismos tiempos que durante el larvicultivo, en intervalos de cuatro horas a partir de las 10:00 a.m. hasta las 6:00 p.m.

Después de la coalimentación, la ración de alimento inerte al día 30 DE fue de 7g por tratamiento (3 réplicas, c/u con aproximadamente 70 juveniles, peso promedio 0.33 g). A partir de este día, la alimentación se dio a saciedad y se incrementó de acuerdo a los requerimientos observados (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de la ración de alimento suministrado por tratamiento, con respecto al día DE y número de peces.

Día DE	Número de peces	Ración de alimento
30	210	7g por tratamiento/día
40	204	8 g por tratamiento/día
41	204	10 g por tratamiento/día
42	204	12 g por tratamiento/día
43	204	15 g por tratamiento/día
45	198	17 g por tratamiento/día
47	198	18 g por tratamiento/día
51	198	21 g por tratamiento/día
53	153	25 g por tratamiento/día
55	153	26 g por tratamiento/día
58	153	Coalimentación 20:5 g
59	153	Coalimentación 15:10 g
60	123	Coalimentación 10:15 g.
61	123	Coalimentación 5:20 g
62	123	25 g por tratamiento/día
74	111	24 g por tratamiento/día
81	105	24 g por tratamiento/día
88	99	24 g por tratamiento/día
95	78	22 g por tratamiento/día
102	72	22 g por tratamiento/día
109	66	22 g por tratamiento/día

El número de ejemplares en cada tanque disminuyó paulatinamente, como consecuencia de las muestras tomadas para el seguimiento semanal (se sacrificaron 6 ejemplares por tratamiento cada semana; al mes se extrajeron 15 ejemplares por tratamiento).

Los juveniles de cabrilla arenosa empleados como muestras fueron sacrificados por asfixia, se les midió la longitud patrón (LP) y el peso (procedimiento descrito en otro apartado). Estas muestras fueron fijadas y preservadas en formol al 10 % tamponado con fosfatos (pH 7).

Del día 55 al 60 DE, se realizó otra coalimentación entre el alimento inerte (en las mismas proporciones mencionadas, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, finalizándose el día 60 con el 100 %). El alimento Lansy CW (200-500 µm) se cambió por Epac CW (800-1200 µm, marca INVE; Tabla 4).

Tabla 4. Análisis proximal del alimento comercial Lansy CW™, utilizado durante el segundo y tercer mes de los experimentos con la 17 MT

Humedad	7%	Vit. A	30,000 IU/kg
Proteína	57%	Vit. D3	2,500 IU/kg
Lípidos	14%	Vit. E	400 mg/kg
Cenizas	12%	Vit. C	1,500 mg/kg
Fibra	1%	Sumo [®] 3 HUFA	30 mg/g dwt
Fósforo	1.2%	DHA/EPA	1.7
Quelatos de cobre de aminoácidos hidratados 10% Cu:		5 mg/kg	
Antioxidantes		BHT/ Etoxiquina/Propilgalato	

En el día 60 DE se cambiaron los filtros de los tanques, se sustituyeron los que tenían malla de 200 µm por filtros con mallas de 1000 µm. El flujo de agua también se incremento de 800 cm³/min a 1200 cm³/min.

6. 7. Evaluación del crecimiento de cabrilla arenera post-tratamientos

Al finalizar el tercer mes de los tratamientos con 17 MT, los ejemplares restantes fueron ubicados en el SCID, colocando 50 ejemplares por tratamiento en tanques cilíndricos de 1,100 l (Figura 13).



Figura 13. SCID, lugar donde se dio seguimiento al crecimiento de los peces una vez finalizados los tratamientos con 17 MT.

En esta ocasión y debido al número insuficiente de tanques, no fue posible tener réplicas. Con la finalidad de evaluar algún efecto de los tratamientos en el crecimiento, los peces colocados en dicho sistema se midieron y pesaron una vez al mes, por los siguientes 6 meses (300 DDE), además de la LP y el peso, se midió también la altura del cuerpo.

También se calculó el factor de condición simple (Rodríguez-Gutierrez, 1992), donde:

$$K = (W/LP^b) * 100$$

en donde: K = Factor de condición

W = Peso en gramos

LP = Longitud patrón en centímetros

b* = Pendiente de la correlación W contra LP

*La estimación del coeficiente se realizó por medio de la regresión de la longitud.

Este factor es considerado como un índice de robustez para peces de tipo fusiforme. Los valores iguales a 3 son considerados como un crecimiento directamente proporcional entre el incremento de longitud y el incremento de peso. Valores mayores o menores a 3 son considerados como crecimiento heterogéneo (no proporcional) (Weatherley y Gill, 1987; Steffens, 1989).

El alimento suministrado durante este periodo fue un alimento comercial AquaXcel™ 4610 (marca Burris Inc., Los Angeles, USA), con un tamaño de partícula de 4000 µm. La composición proximal proporcionada por la empresa Burris INC., es la siguiente:

Composición Nutritiva	Garantizado
Proteína	46.0%
Lípidos	10.0%
Fibra	2.0%
Ceniza	11.0%

Este alimento se administró dos veces al día, a las 10: a.m. y a las 3 p.m. en dos raciones de 34 gr.

Al finalizar la experimentación (300 DDE), se sacrificó el total de los peces, mismos que fueron pesados y se les determinó el sexo. A cada ejemplar se le extrajo tanto la gónada como el hígado

Con esta información, se calculó el Índice Gonadosomático (IGS) y el Índice Hepatosomático (IHS), esto fue realizado según lo mencionado por Ericsson *et al.* (1985):

$$\text{IGS} = \frac{W_g}{W_t} \times 100$$

Donde: IGS= Índice Gonadosomático

Wg = peso de la gónada

Wt = peso total del organismo

$$\text{IHS} = \frac{W_h}{W_t} \times 100$$

Donde: IHS= Índice Hepatosomático
Wg = peso del hígado
Wt = peso total del organismo

6.8. Determinación cuantitativa de 17 MT en el agua del Sistema Cerrado-18.

Como medida precautoria para evitar un impacto con el medio ambiente por los residuos generados por el sistema de cultivo, se evaluó la efectividad de la luz ultravioleta como un medio para eliminar la 17 MT en el sistema de larvicultivo. Para esto se tomaron muestras del agua del mismo sistema y fueron congeladas a -80 °C hasta su evaluación.

Se detectó la presencia de la 17 MT por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando un HPLC Perkin Elmer Series 200 equipado con un sistema de bombas cuaternario, automuestreador, detector de arreglo de diodos de Applied Biosystem 1000S con longitud de onda fijada a 242 nm. La fase estacionaria utilizada fue una columna SUPelcosil™ (LC-18DB fase reversa), de 25 cm x 4.6 mm, empacada con partículas de 5 µm (flujo 1 mL/min). Una fase móvil agua:acetonitrilo (6:4) por 30 minutos. La absorbancia de los componentes es monitoreada a 242 nm. El programa de elusión utilizado durante este proceso se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Programa de elusión para establecer el método para la determinación de la 17 MT, mediante el HPLC.

Paso	Tiempo (min.)	Flujo (ml/min.)	% MeCN (acetonitrilo)	% H ₂ O	Curva
0	2	1	40	60	0
1	25	1	40	60	0
2	20	1	100	0	0
3	3	1	40	60	1
4	15	1	40	60	0

Para fines cuantitativos se realizaron mediciones para observar la respuesta de la 17 MT en el sistema cromatográfico midiendo la relación cuantitativa entre el área bajo el pico y la concentración de la 17 MT. Con base en esto se realizó la siguiente calibración del método.

Se preparó una solución madre a una concentración de 10 mg/ml empleando etanol como disolvente. A partir de la solución madre se prepararon las diluciones

1/10, 1/50, 1/100 y 1/1,000, la cuales fueron inyectadas al HPLC de acuerdo con la tabla 6.

Tabla 6. Concentración final de la 17 MT inyectada al HPLC en el tiempo de retención, área bajo la curva y altura del pico.

Concentración de la solución stock	Dilución	Concentración de la 17 MT en la dilución	Alícuota inyectada al HPLC	Concentración neta de 17MT inyectada
10 mg/ml	1	10 mg/ml	10 µl	100 µg
	1/10	1 mg/ml	10 µl	10 µg
	1/50	0.5 mg/ml	10 µl	5 µg
	1/100	0.1 mg/ml	10 µl	1 µg
	1/1000	0.01 mg/ml	10 µl	0.1 µg

Para determinar la 17 MT en las muestras de agua del SC-18, estas fueron descongeladas y homogenizadas vigorosamente por agitación. Se tomaron 10 ml de cada muestra y se trataron individualmente de la siguiente manera: Pasaron al vacío a través de un cartucho de extracción en fase sólida (Alltech) empacado con sílica gel C18. Inmediatamente después de haber pasado el agua, el cartucho se lavó con 3 ml de etanol destilado. El lavado con etanol se colectó enteramente en un vial de borosilicato. El lavado alcohólico se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45 µm para eliminar partículas suspendidas y fue concentrado a presión reducida hasta sequedad.

6. 9. Cuantificación de ARNm codificante para aromatasa en la cabrilla arenera.

En juveniles de cabrilla arenera se procedió a evaluar los transcritos de la enzima aromatasa. Para esto se sacrificaron semanalmente 3 ejemplares tomados al azar por tratamiento.. A los juveniles sacrificados se les cortó un segmento comprendido entre el ano y la aleta pectoral, el cual fue depositado en tubos Eppendorf. Se fijaron en formaldehído para FISH (Hibridación fluorescente *in situ*) y se incluyeron en RNA^{later}[®] (Ambion, Inc.) para qPCR (PCR en tiempo real) y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis (Figura 14).



Figura 14. Segmento cortado de cabrilla arenera para el análisis de la actividad de aromatasa.

La cuantificación de los transcritos de la aromatasa se realizó en varias etapas, la primera consistió en la extracción del ARN total mediante el método descrito para el reactivo de TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, USA). Para lograr esto, se llevaron a cabo 5 pasos; homogenización, fase de separación, precipitación del ARN, lavado del ARN y resuspensión final.

Homogenización

En el laboratorio de Fisiología Comparada del CIBNOR, se homogenizaron las muestras de cabrilla arenera colocándose una a la vez, en un tubo Eppendorf (1.5 ml) con 1 ml de TRIZOL y 50 a 100 mg de tejido (por muestra), Se utilizó el homogenizador de tejidos marca Pro 200 a 2000-3000 rpm en un tiempo de 30

segundos; el volumen de la muestra no excedió el 10% del volumen de TRIZOL usado durante la homogenización. La extracción de ARN total se realizó mediante el reactivo TRIZOL, siguiendo las instrucciones del fabricante que a continuación se describen.

Fase de separación

Se incuba el homogenizado 5 min a temperatura ambiente, se agrega cloroformo (0.2 ml/ml de TRIZOL), se agita manualmente durante 15 segundos y se incuba 2-3 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifuga a 12,000 g por 15 min. De las tres fases obtenidas, se recupera la superior (acuosa; figura 25), que deberá representar el 60% del volumen de TRIZOL utilizado para la homogenización. Se cuida de no contaminar con la fase intermedia (proteica y debris celular).

Precipitación del ARN

Se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio y se precipita el ARN con alcohol isopropílico (0.5 ml/ml de TRIZOL), se incuba 10 min. a temperatura ambiental y se agita manualmente. Se centrifuga a 12,000 g, por 10 minutos a 4°C.

El ARN precipitado se pudo apreciar en el fondo de forma translúcida. En caso de que no se pudiera ver claramente, se deja precipitar una noche

Lavado del ARN

Se elimina el sobrenadante y se lava el sedimento con alcohol al 75% con agua DEPC (dietil pirocarbonato; 1 ml/ml de TRIZOL). Se agita en Vortex a la mitad de su intensidad máxima y se centrifuga a 7,500 g por 5 minutos a 4°C.

Resuspensión del ARN

Se elimina el sobrenadante y se deja secar el tubo boca abajo para que se evapore el alcohol cuidando de no perder el precipitado. Se resuspende el RNA con 40-50 µl de agua DEPC. De ser necesario, se calienta 5 minutos a 55°C para disolver el precipitado. Se dividen los 40 µl en dos alícuotas de 20 µl y se congelan

a -80°C. Con una de esas alícuotas se procede a la eliminación del DNA genómico mediante el uso de DNAsa I y posteriormente se procede a la obtención del cDNA.n

La siguiente etapa consistió en realizar la retrotranscripción del RNA a cDNA mediante el kit de Improm II® (Promega). Una vez obtenido el cDNA, se amplificaran los segmentos de los genes de interés, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los primers y condiciones descritas en la figura 15. Esto se realizó en un Termociclador iCycler de Bio-Rad con sistema de gradiente de temperatura, optimizándose en términos de temperatura de alineamiento (65 °C) y concentración de Mg²⁺. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis.

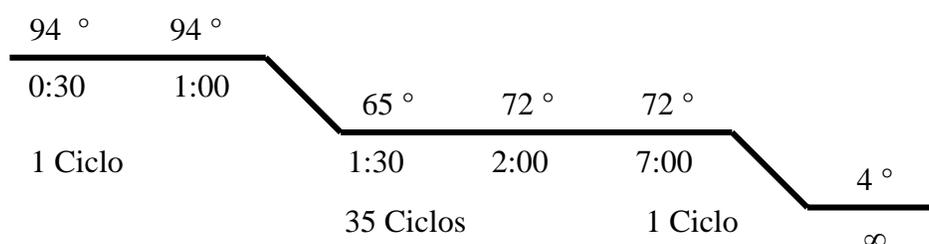


Figura 15. Condiciones de corrimiento por PCR

Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de las secuencias de *Epinephelus coioides* (AY735015) y *Oryzias latipes*, medaka japonés (D82968) registradas en Genbank (Tabla 7).

Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para amplificar por PCR.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5´- 3´)
Aromatasa	Directo	ACACAGACTCACCTGGACGACCT
	Reverso	AGCTCCTGGGCTGCTGTCTTGTG

La recuperación y purificación del cADN se obtuvo cortando las bandas de interés con un bisturí estéril en un transiluminador y en base al protocolo del kit GENE CLEAN SPIN KIT (BIO 101 INC, CA, USA).

Finalmente, los segmentos amplificados por PCR se clonaron de acuerdo al protocolo del kit TOPO TA CLONING (INVITROGENE, The Netherlands) utilizando células competentes de *E. coli* y el plásmido pCR 2.1 como vector. Una vez clonados, se obtuvieron los plásmidos de las células de *E. coli* por Miniprep usando el procedimiento del kit RPM (BIO 101 INC, CA, USA) para enviarse a secuenciar (Macrogen, Korea) para verificar los fragmentos y obtener sus homologías con los bancos de secuencias.

La cuantificación se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando sondas específicas para la aromatasa de la cabrilla arenera, por medio de sondas TAQMAN® en un equipo ABI PRYSM 7000 SDS (Applied Biosystems). La expresión relativa se efectuó en base a la expresión basal del gen codificante para la fracción 18 S ribosomal (ARN 18s) por medio de curvas estándar de los fragmentos 18s y aromatasa ligados al plásmido pCR 2.1.

6.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las biometrías mensuales realizadas, en cuanto a peso y longitud y del peso de la gónada y del hígado, se sometieron a pruebas de normalidad y homocedasticidad (Cochran y Bartlett). Los postulados se cumplieron en todos los casos y se procedió a realizar un análisis de varianza de una vía, con ayuda del paquete estadístico STATISTICA, versión 7.0 de StatSoft.

7. RESULTADOS

7. 1. Identificación del periodo lábil en la cabrilla arenera

Como resultado del análisis histológico en larvas derivadas de experimentos previos (preservados en formol al 4%, Figura 16), se pudo estimar una talla en la cual hacen su aparición células germinativas. Este dato tiene su importancia en poder estimar el inicio de los tratamientos hormonales el cual se recomienda empezar antes de que se diferencie sexualmente (Solar *et al.*, 1984).

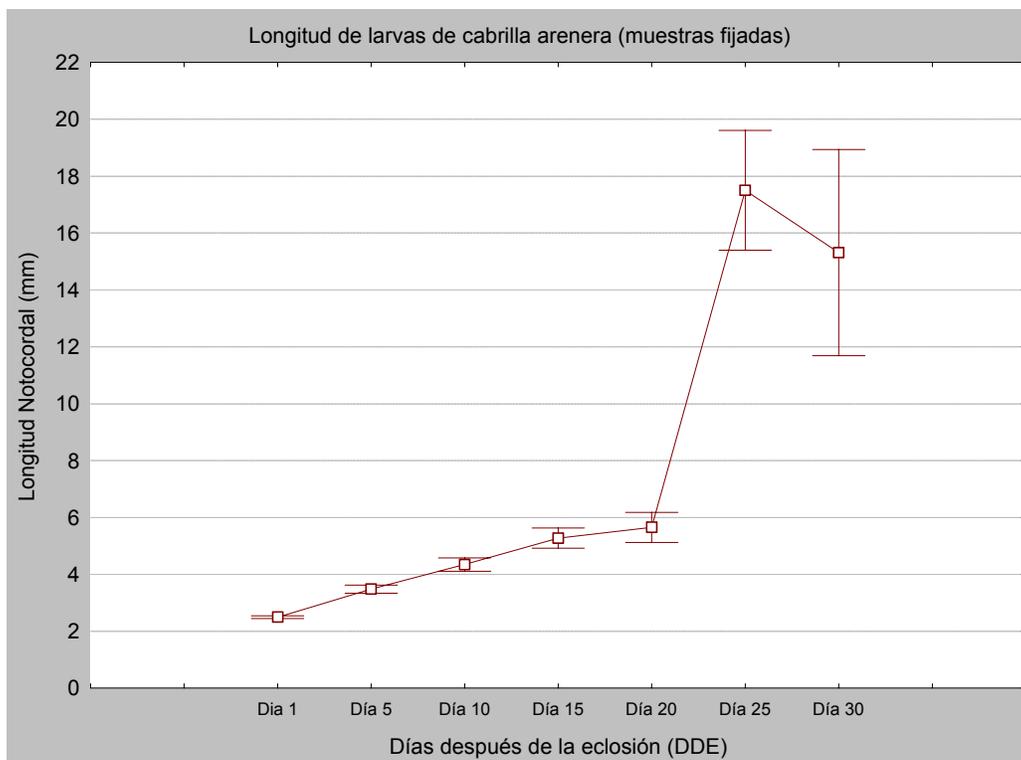


Figura 16. Distribución de tallas de los ejemplares de cabrilla arenera, analizados para determinar la longitud en que aparecen las células germinales

Con base en lo anterior, se encontró que a la talla de 18 mm (25 DDE) ya era posible encontrar células germinativas, pero aún no era posible hacer ninguna diferenciación sexual (Figura 17), de manera que es posible influir su diferenciación sexual la cual se encuentra en desarrollo.

Detección de células germinativas (ejemplares de laboratorio)

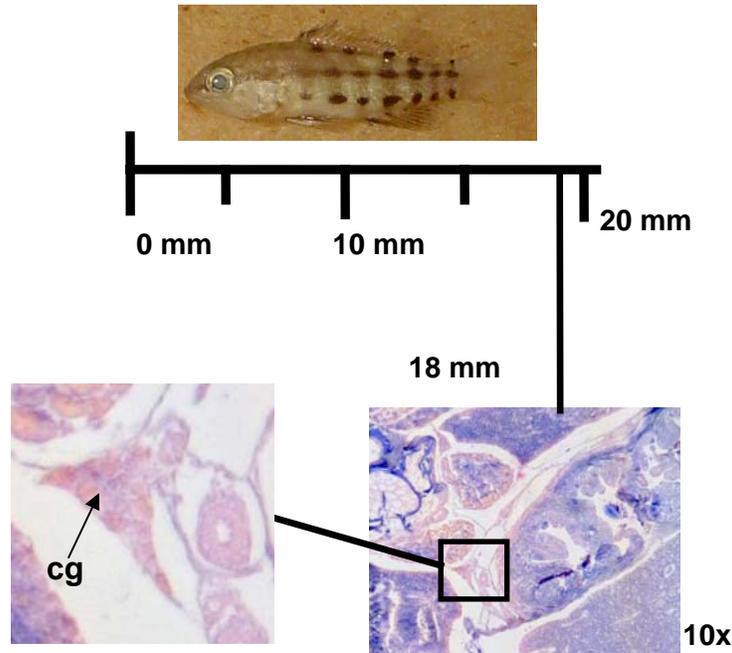


Figura 17. Células germinales (cg) a partir de ejemplares de 18 mm cultivados en laboratorio. Los cortes histológicos se tiñeron con la técnica Tricómica de Mallory.

Con los resultados anteriores se obtuvo el límite inferior en el cual es posible iniciar los tratamientos hormonales. El límite superior se obtuvo de las muestras de juveniles de cabrilla arenera, capturadas en campo mediante arrastres usando un chinchorro charalero. De los organismos recolectados ($n=15$), el intervalo de tallas fue entre los 43 y 74 mm de longitud patrón. De esto se encontró que juveniles de 43 mm presentan oocitos perinucleolares, lo cual es evidencia que a partir de esta talla la diferenciación sexual en la cabrilla arenera ya ha sido iniciada. Por otra parte esto nos permitió diferenciar sexualmente a los ejemplares recolectados. En todos los casos se encontró hembras inmaduras, incluso al llegar a la talla máxima recolectada de 74 mm, aún en este caso se tuvo el diagnostico de hembra inmadura (Figura 18).

Detección de hembras inmaduras (ejemplares de campo)

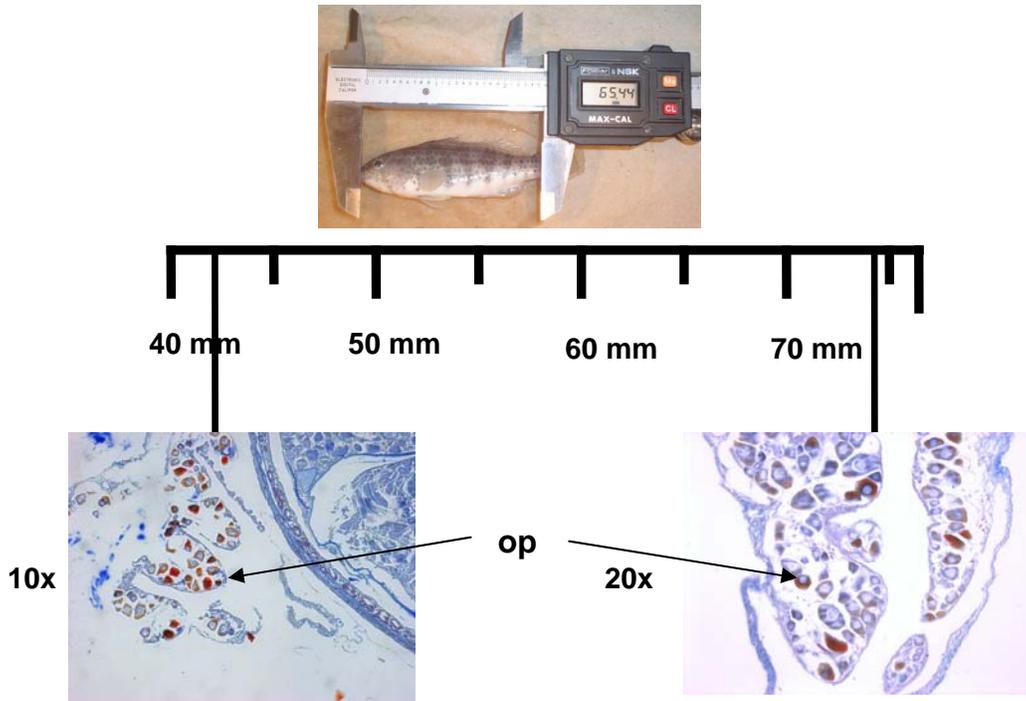


Figura 18. Ejemplar de cabrilla arenera recolectado en campo. Se observan oocitos perinucleolares (op). Los cortes fueron teñidos usando la técnica de tinción Tricrómica de Mallory.

Con los resultados encontrados en esta exploración, es posible hacer el siguiente diagnóstico: el periodo lábil o crítico en el cual se debe de administrar la hormona es a partir de los 18 mm (≈ 30 DDE) y antes de los 40 mm (≈ 60 DDE) de longitud patrón (L.P.).

Estos resultados, además de permitir ubicar el periodo lábil, nos permite corroborar la condición protogónica de la cabrilla arenera, reportada en peces capturados en el medio natural.

7.2. Captura y acondicionamiento de los reproductores

A los reproductores se les determinó el sexo y fueron colocados en una proporción de 3:2 (hembras:machos), con un peso y talla promedios totales de 172.96 g y 18.60 cm de longitud patrón (L. P.), para los machos y 173.53 g y 18.98 cm (L.P) para las hembras (Tabla 9).

Tabla 8 Biometría inicial de los reproductores, el desove provino del tanque 6 (recuadros coloreados).

Long. patrón (cm)	Tanque					
	1	2	3	4	5	6
♂ (n=4)	19.8 ± 1.8	17.6 ± 2.6	18.5 ± 2.4	18.0 ± 2.7	18.75 ± 2.7	19.0 ± 1.8
♀ (n=6)	18.8 ± 2.4	19.3 ± 1.5	19.2 ± 2.0	19.6 ± 1.3	17.9 ± 0.6	18.9 ± 1.7
Peso total (g)						
♂ (n=4)	212.8 ± 61.2	150.5 ± 73.9	171.8 ± 75.7	156.0 ± 74.9	166.5 ± 64.3	180.3 ± 50.7
♀ (n=6)	179.7 ± 70.1	190.3 ± 40.3	177.3 ± 49.0	189.3 ± 35.0	142.5 ± 17.9	162.0 ± 41.0

Durante el período de acondicionamiento de los reproductores se obtuvieron diversos desoves. Sin embargo, se tenía que sincronizar en tener un desove de un volumen suficiente (mayor a 60 ml) y que la producción de alimento vivo tuviera las densidades adecuadas, además de que el sistema de larvicultivo (SC-18) en su conjunto presentara la madurez suficiente para soportar la densidad de larvas que se requería sembrar. Finalmente, el 23 de marzo (50 días después de la captura), se obtuvo un desove de 80 ml (149, 360 huevos, aproximadamente), el cual fue utilizado para iniciar el experimento.

En un ensayo sobre la calidad del desove, este fue evaluado, los datos se muestran en la tabla 9, estas pruebas fueron realizadas para corroborar que la calidad del desove utilizado fuera la adecuada. Además, también se evaluó la supervivencia larval, con la idea de garantizar el éxito del cultivo durante este periodo.

Tabla 9. Resultados de la calidad del desove utilizado.

Tasa de eclosión	Supervivencia a la eclosión
98.81 %	96.43 %
68.41 %	Promedio de supervivencia al estrés osmótico

Los reproductores mostraron en general buenas condiciones de salud, no se detectaron enfermos, ni muertes durante el período en que se obtuvo el desove para iniciar la experimentación. En la figura 19 se puede apreciar el incremento en los volúmenes obtenidos, lo cual indica el buen estado de los reproductores, de forma particular se observan los desoves de los peces del tanque 6, del cual se obtuvo el desove utilizado en el presente experimento.

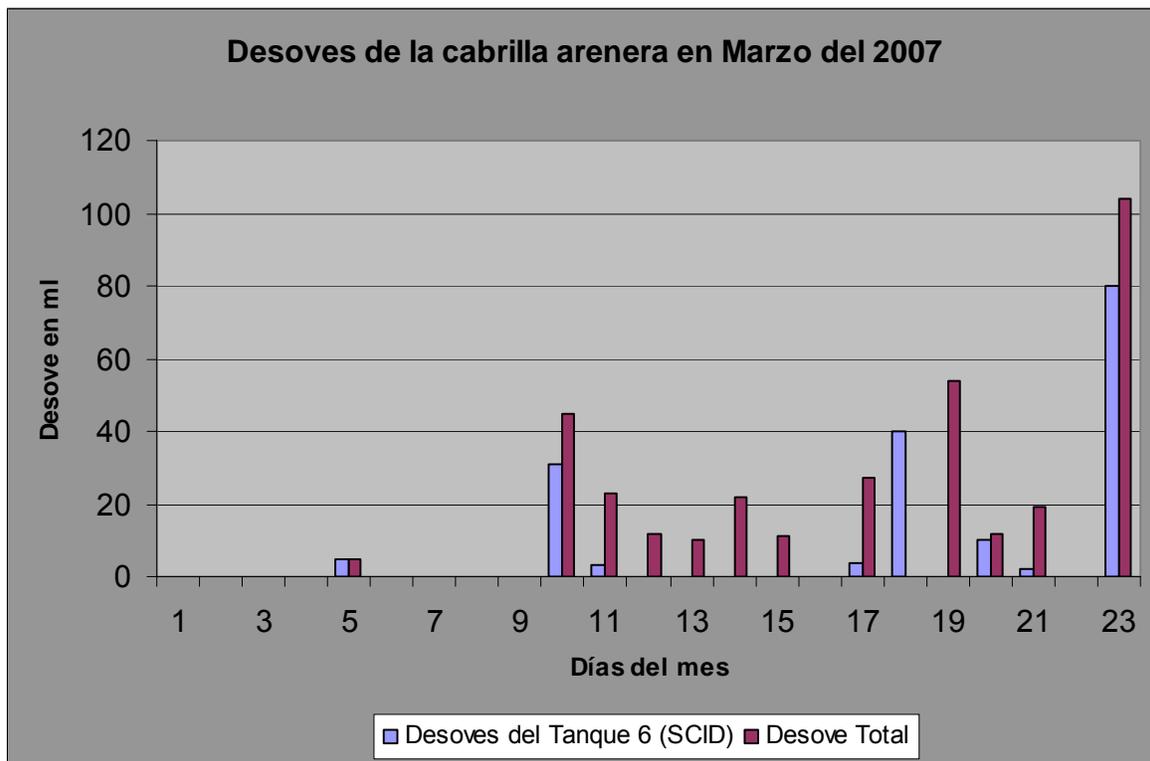


Figura 19. Comportamiento reproductivo de la cabrilla en las instalaciones del CICIMAR indicado como volumen de desoves.

7.3. Cría larvaria de la cabrilla arenera

La cría larvaria se desarrolló de acuerdo a lo establecido por Alvarez-Gonzalez (1999). La mayoría de las variables ambientales se mantuvieron relativamente estables. El valor promedio de temperatura registrado fue de 24 (\pm 0.46 °C), el promedio de salinidad fue de 37 (\pm 0.28 ppm), los valores de NH₃ se mantuvieron menores de 0.3 ppm. El oxígeno disuelto presentó una ligera variación, en promedio de 7.45 mg/l durante la primera semana, con una tendencia a disminuir a 6.55 mg/l en las siguientes 3 semanas, estabilizándose en un valor promedio de 4.60 mg/l a partir del día 30 de experimentación.

El larvicultivo dio inicio con la siembra de 3.2 ml del desove en cada tanque, en pruebas realizadas para evaluar la calidad del desove se estimó un porcentaje de eclosión del 90 %. A partir del día 1 DE y hasta el día 30 DE, la supervivencia obtenida fue del 8 % (Tabla 10).

Tabla 10. Datos de eclosión y supervivencia de larvas de cabrilla arenera.

Número de huevos sembrado/tanque	No. de eleuteroembriones a la eclosión	Supervivencia al inicio del periodo larval
5,974	5,376	90 %
Número de larvas al día 30 DE/tanque	Porcentaje de supervivencia durante el cultivo larval	
430	8 %	

Durante el desarrollo del cultivo larval no se presentaron eventos relevantes en cuanto a la presencia de algún tipo de bacteria, hongos o virus. Al menos no de la manera que pudiera ser importante su presencia para afectar la supervivencia de las larvas de la cabrilla arenera. En dos ocasiones hubo brotes de la presencia de pseudomonas en el fondo del tanque, lo cual se resolvió solo con la rutina de limpieza al sifonear. Estos brotes se presentaron los días 5 y 14 DE, después de la limpieza, al siguiente día ya habían desaparecido casi en su totalidad.

Considerando la completa formación de elementos pares (aletas pectoral y anal), patrones de escamación completos, y formación del resto de las aletas, se

consideró que al día 30 DE, ya se había terminado el período larval e iniciado el período juvenil (Figura 20).

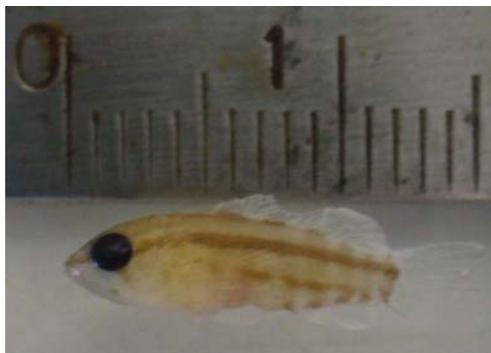


Figura 20. Juvenil de cabrilla arenera al momento de finalizar los 30 DDE.

Durante los cambios de alimentación, tampoco se observó mortalidad como consecuencia del estrés que pudiera haber sido causada por el cambio de alimento. El promedio de tallas y pesos que dieron fin al periodo larvario se muestran en la tabla 12.

Tabla 11. Relación de pesos (g) y longitud notocordal (mm) de la cabrilla arenera al finalizar 30 DDE (n= 15).

No.	Peso (g)	L.N. (mm)
1	0.54	13.0
2	0.35	12.0
3	0.38	13.0
4	0.56	13.0
5	0.36	12.0
6	0.28	11.0
7	0.38	10.5
8	0.36	10.5
9	0.28	10.0
10	0.28	10.0
11	0.36	11.0
12	0.26	10.0
13	0.26	10.0
14	0.15	5.0
15	0.23	10.0
Promedio	0.3	10.73

Después de haberse realizado el larvicultivo con buenos resultados, se procedió a iniciar la parte correspondiente a los tratamientos con la 17 MT.

7.4. Diferenciación de células germinales en juveniles de cabrilla arenera

En los organismos obtenidos por desove para implementar el presente experimento se analizaron ejemplares de 30 DDE, para diagnosticar el estado de desarrollo gonadal previo al inicio de los tratamientos hormonales. De estos organismos se determinó que en esa edad aún no se manifestaba un desarrollo gonadal avanzado, por el contrario, las células germinales no presentaron una diferenciación importante con respecto al resto de las células somáticas (Figura 21). Las gonias o células primordiales gonadales (CPG) se pudieron identificar de acuerdo a la posición en la cual se encontraban, esto es, adyacentes al riñón, del cual proviene un conducto que los une (Smith, 1965). Además, se mantienen de forma pareada, lo cual permite diagnosticar la presencia de este tipo de estructuras.

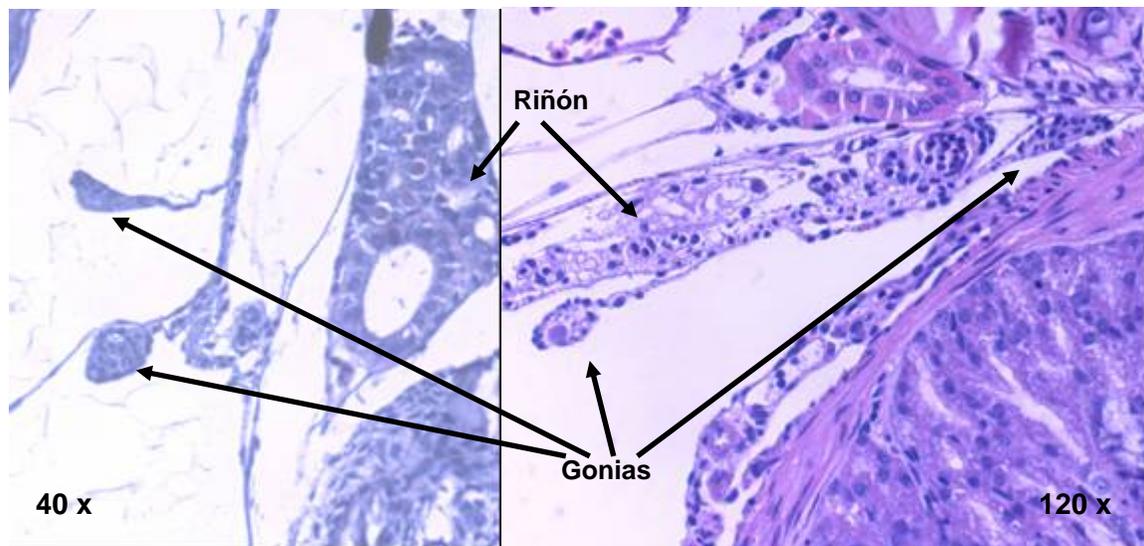


Figura 21. Gonias de 2 ejemplares de juveniles de cabrilla de 30 DDE. Las células germinativas, se ubican por la posición y por ser estructuras pareadas.

La presencia de las CGP's en el día 30 DE, nos permitió corroborar que en este tiempo aún no se diferencian las gónadas, pero por otra parte sí nos indica que el desarrollo ha iniciado. La dificultad para diferenciar las células germinales, nos lleva a confirmar que los tratamientos hormonales iniciaron en un momento adecuado, cumpliendo con la premisa de iniciar antes de la diferenciación sexual.

Al día 30 DE, el promedio en peso y talla de los ejemplares a los cuales se les hizo histología fue de 0.03 g y 10.73 mm, respectivamente.

Durante las semanas siguientes se hicieron análisis histológicos, las muestras correspondieron a semanas progresivas. El seguimiento del desarrollo gonadal no fue adecuado, de la evidencia de células germinativas, se pasó a la gónada masculina diferenciada (esto en un mes de iniciados los tratamientos hormonales).

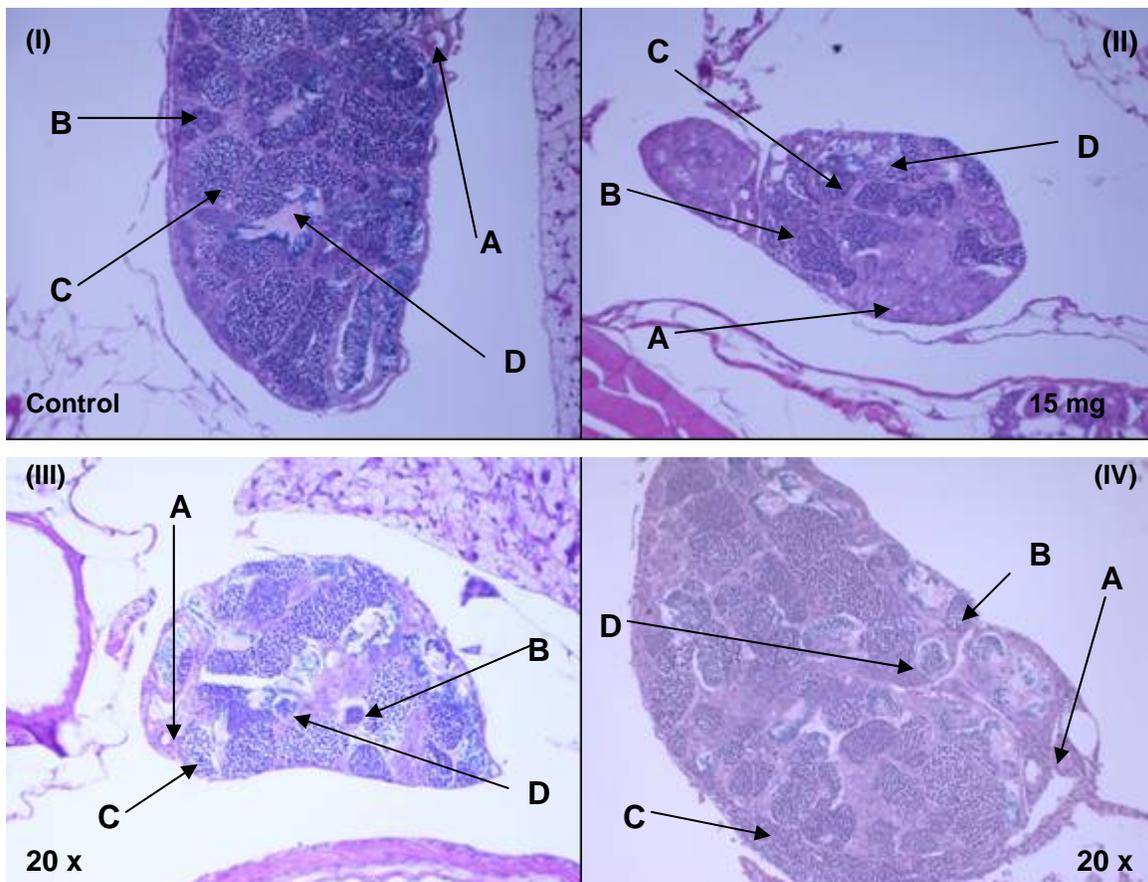


Figura 22. Cortes histológicos de gónadas obtenidas a los 60 DDE. Los cortes corresponden a los tratamientos control (I), 15 mg/Kg (II), 30 mg/Kg (III) y 60 mg/Kg (IV). En todos los casos se observa un desarrollo avanzado de tejido testicular, pudiéndose apreciar espermatogonias (A), espermatocitos (B), espermatides (C) y espermatozoides (D).

Dentro de la evidencia encontrada, a los 60 DDE (primer mes de iniciados los tratamientos con hormona) se observaron gónadas diferenciadas (Figura 22 y Tabla 12), principalmente en los controles, en las cuales todas las muestras con

gónada podían diferenciarse sin problema, en vista de que todas las muestra de gónada analizadas, tenían cierto grado de madurez.

En los meses subsecuentes, el desarrollo de la gónada fue similar, presentándose en todos los casos, gónadas con mayor grado de desarrollo en los lotes de control, que en los tratamientos.

Tabla12. Relación de peso y talla de los peces mostrados en el análisis histológico de la figura 28.

Tratamiento	Peso (g)	LP (cm)
Control	5.04	6.1
15 MT	3.16	5.1
30 MT	2.74	5.1
60 MT	4.65	6.1

7. 5. Enriquecimiento del alimento inerte con la 17 MT

El enriquecimiento del alimento inerte con 17 MT no presentó mayores dificultades y considerando los efectos producidos en el desarrollo de las gónadas y en la diferenciación sexual a machos, el enriquecimiento se considera que fue adecuado.

7. 6. Juveniles de cabrilla arenera sometidos a tratamientos con 17 MT

Se evaluó el tiempo y dosis de administración de la hormona en términos de eficiencia en la masculinización. Al concluir el primer mes de tratamientos hormonales (60 DDE), se determinó el porcentaje de masculinización en cada uno de los tratamientos, incluido el control.

Los resultados fueron los siguientes:

En la tabla se muestra una relación del análisis histológico y se puede apreciar una notoria ausencia de gónadas femeninas. Considerando lo anterior, se puede decir que, al primer mes el porcentaje de masculinización es del 100 % en las gónadas diferenciadas (Tabla 13).

Tabla 13. Estado de las gónadas al finalizar el primer mes de tratamientos con 17 MT. En el recuadro “sin diagnóstico”, no se pudo determinar la presencia de células germinales.

Tratamiento	Análisis histológico de las gónadas (primer mes de tratamiento, 60 DDE)				
	Maduras	Inmaduras	Indiferenciadas	Sin gónada	Total
Control	8	0	0	7	15
15 MT	7	1	0	7	15
30 MT	2	2	2	9	15
60 MT	5	0	1	9	15

Para el segundo mes de aplicados los tratamientos (90 DDE), los resultados fueron similares con respecto a las gónadas diferenciadas, el total de estas nuevamente fue del 100 % (Tabla 14).

Tabla 14. Evaluación de las gónadas al finalizar el segundo mes de tratamientos con 17 MT.

Análisis histológico de las gónadas (segundo mes de tratamiento, 90 DDE)					
Tratamiento	Maduras	Inmaduras	Indiferenciadas	Sin gónada	Total
Control	9	0	0	6	15
15 mg MT	3	0	1	11	15
30 mg MT	1	2	0	12	15
60 mg MT	6	4	0	5	15

Para la evaluación del tercer mes de tratamientos hormonales, al finalizar los tratamientos, se separaron lotes de 50 ejemplares tomados al azar (1 lote por cada tratamiento) y se mantuvieron por 6 meses más con el fin de lograr una mayor talla y garantizar un mayor desarrollo de la gónada y poder hacer un diagnóstico mas certero en cuanto al porcentaje de masculinización. En este caso se sacrificaron 30 ejemplares por cada tratamiento y se hizo el análisis pertinente. En el total de las muestras analizadas por histología, no se encontró en ningún caso evidencia de gónadas de hembras, incluidos los peces provenientes de los lotes control (Tabla 15).

Tabla15. Evaluación de las gónadas al finalizar 297 DDE.

Análisis histológico de las gónadas (297 DDE)					
Tratamiento	Maduras	Inmaduras	Indiferenciadas	Sin gónada	Total
Control	30	0	0	0	30
15 mg MT	15	0	0	15	30
30 mg MT	16	2	0	12	30
60 mg MT	16	1	0	13	30

En la tabla 16, se puede apreciar también el porcentaje de esterilidad. Este resultado fue notorio en los tratamientos con las distintas dosis, obteniéndose cerca del 50 % de individuos sin gónada y un 100 % de estériles, en contrastante con el control en donde no hubo ningún caso de esterilidad.

En la figura 23, se aprecian algunos de los casos en los que el desarrollo fue normal y también en los que no hubo desarrollo de gónada y vejiga natatoria (VN). La presencia o ausencia, inflación o no inflación de la VN fue indistintamente para todos los peces, independientemente del tratamiento e incluso de los controles.

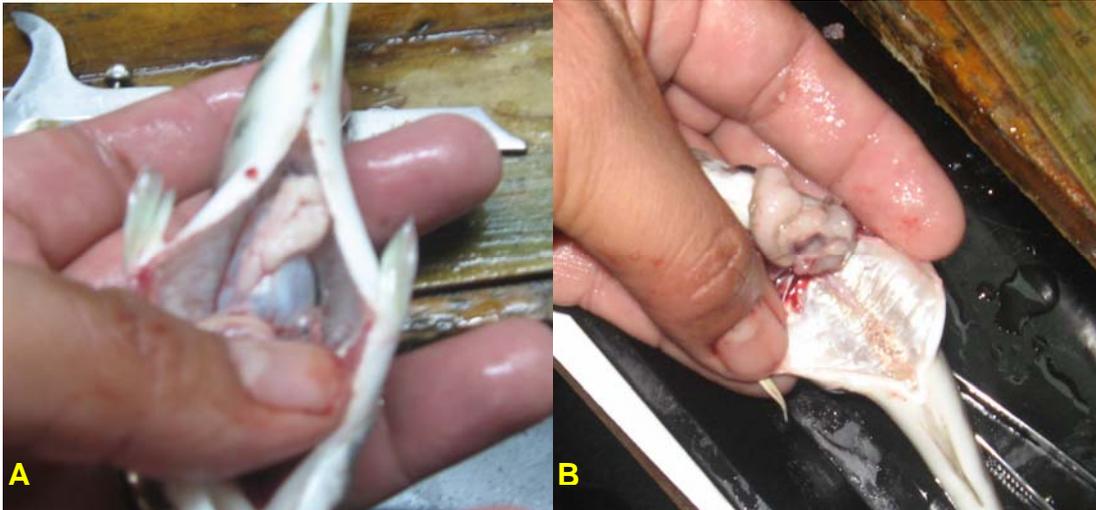


Figura 23. Se aprecia una fotografía con una gónada y vejiga natatoria (VN) bien desarrollados (pez control) (A) y una fotografía donde no hubo desarrollo ni de gónada ni VN (pez con 17 MT) (B).

La figura 24 muestra diversos casos de desarrollos anormales de gónada y de casos en los que no hubo desarrollo de VN, todos los casos mostrados en esta figura corresponden a peces sometidos a tratamientos con 17 MT.



Figura 24. Casos con poco desarrollo o desarrollo anormal de la gónada: en la fotografía A; se aprecia la gónada en poco desarrollada y sin conducto aparente al exterior (tampoco hay Vejiga Natatoria, VN), en la fotografía B; si se desarrollo la VN pero la gónada tiene una forma cúbica y tampoco se observan conductos al exterior; C, la gónada muestra una forma peculiar con segmentos esféricos pequeños (como pequeño "rosario"); finalmente en D, no hay presencia de gónada aunque si de la VN, todos los casos son de peces tratados con 17 MT.

7. 7. Evaluación del crecimiento de cabrilla arenera post-tratamientos

Durante el tiempo que duró el experimento con los tratamientos con 17 MT (del día 30 al 120 DE), al finalizar cada mes (60, 90 y 120 DDE) se tomaron muestras y se realizaron biometrías. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$; Figura 25) en cuanto al peso.

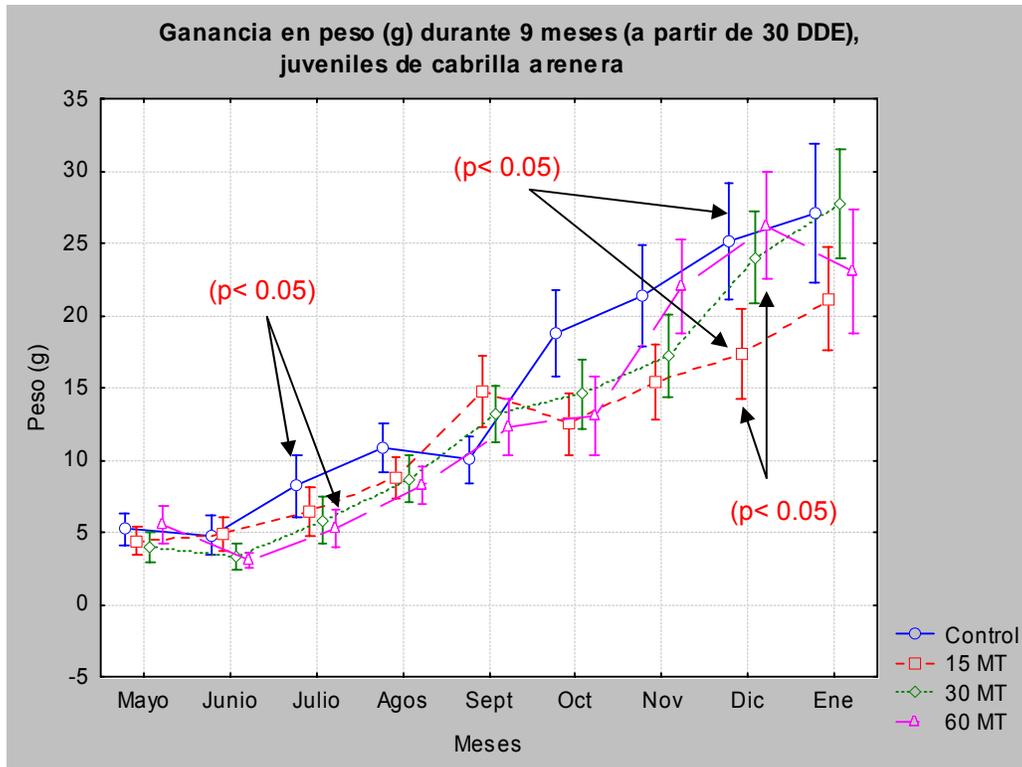


Figura 25. Líneas de crecimiento indicando valores promedio de la ganancia mensual en peso (\pm IC). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos están señaladas con flechas.

Esta diferencia, para los meses con tratamientos con 17 MT (mayo-julio), se reflejó sólo para el mes de julio entre el control y el tratamiento con 60 MT, aunque en todos los casos, el crecimiento fue mejor para los peces control. Para los meses restantes (agosto-enero), los cuales correspondieron a cría postratamiento, para el mes de diciembre también hubo diferencia significativa ($p < 0.05$). En este caso, la diferencia fue de los peces control con el tratamiento de 15 MT y entre el

tratamiento de 60 MT con el de 15 MT, en ambos casos el tratamiento 15 MT presento valores más bajos. Esto mismo se observa en la figura 26.

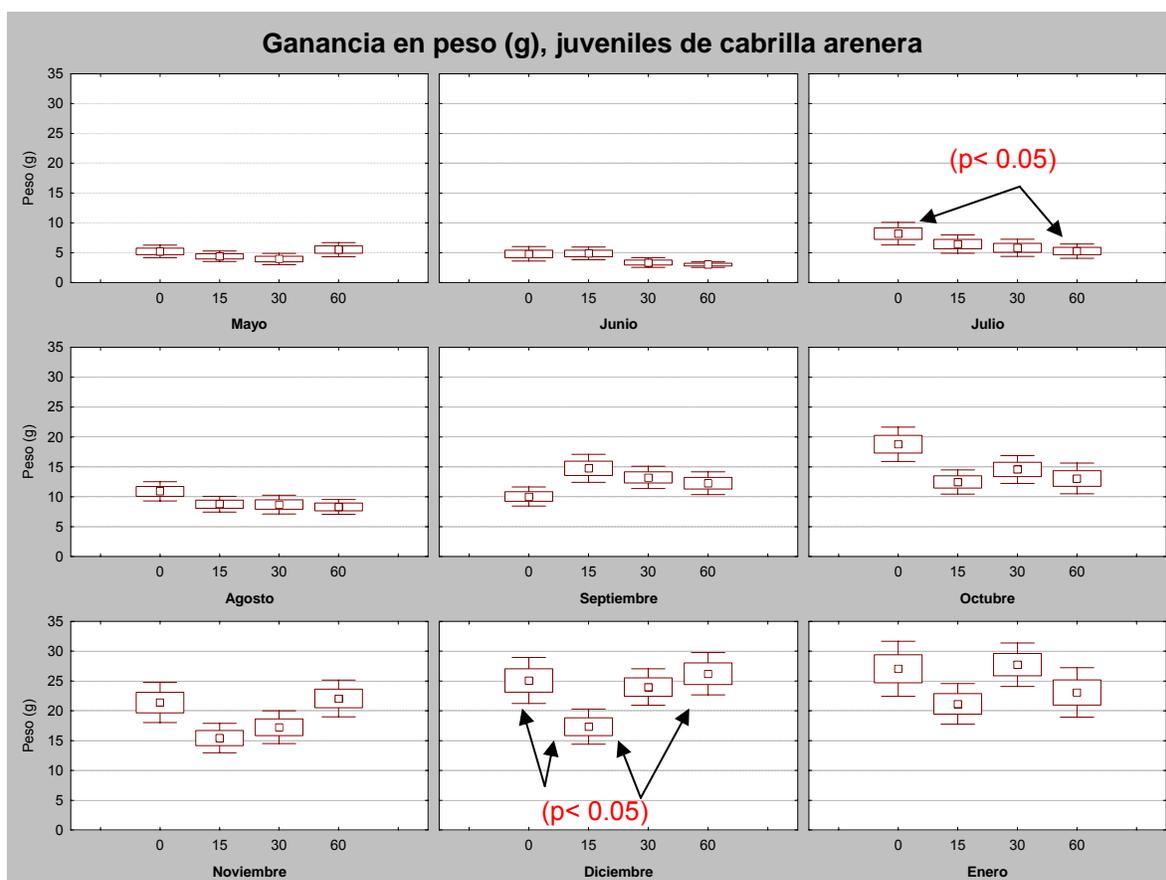


Figura 26. Diagramas de caja de los valores de peso observado (mensualmente), correspondiente a los análisis de variancia. Las flechas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para el crecimiento en talla (cm). Al igual que para el peso (g), se observa una tendencia de mayor crecimiento para los peces del grupo control. Lo anterior ocurrió durante todos los meses en que se desarrolló el experimento, tanto en el tiempo en que se llevó a cabo la experimentación sometidos a los tratamientos hormonales, como cuando se llevó el seguimiento postratamiento. Es conveniente señalar que durante los

meses de mayo a julio, las muestras utilizadas para las biometrías fueron tomadas sin reemplazo (se sacrificaron) y al azar.

Para septiembre, de la misma forma se observa una disminución de tallas en los peces control, esto también pudo ser porque el muestreo fue hecho al azar y no siempre se les realizó biometría a los mismos peces (Figura 27).

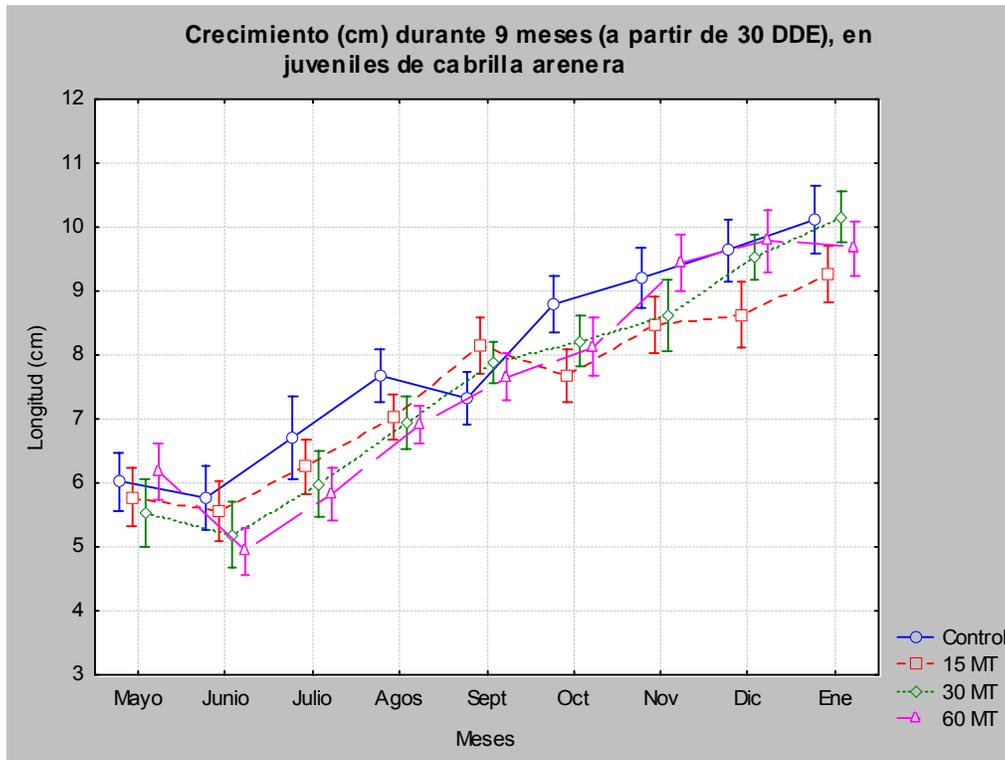


Figura 27. Valores promedio (\pm IC) del crecimiento en longitud (cm) observado a lo largo del experimento.

El valor máximo alcanzado tanto en peso como en talla, correspondió a un pez derivado del tratamiento con 60 MT y fue: 72.26 g y 13.7 cm, le siguieron en orden de mayor a menor; 69.77 g y 13.7 cm (pez control), 55.33 g y 12.4 cm (pez 30 MT), finalmente, en el tratamiento de 15 MT se presentó un máximo valor de 44.95 g y 12 cm. Estos valores son reportados para el mes 10 (300 DDE), cuando se sacrificaron todos los individuos. De igual modo, para los 300 DDE, los valores menores registrados fueron los siguientes, colocados de menor a mayor; 7.76 g y 6.9 cm (15 MT), 8.99 g y 7.6 cm (control), 10.18 g y 8 cm (60 MT), 14.65 g y 8.7 cm (30 MT).

En la figura 28, se puede apreciar la similitud entre los datos durante todas las biometrías mensuales realizadas, se observan lecturas mayores de datos en los peces control, sin embargo la línea que representa la media no muestra diferencia.

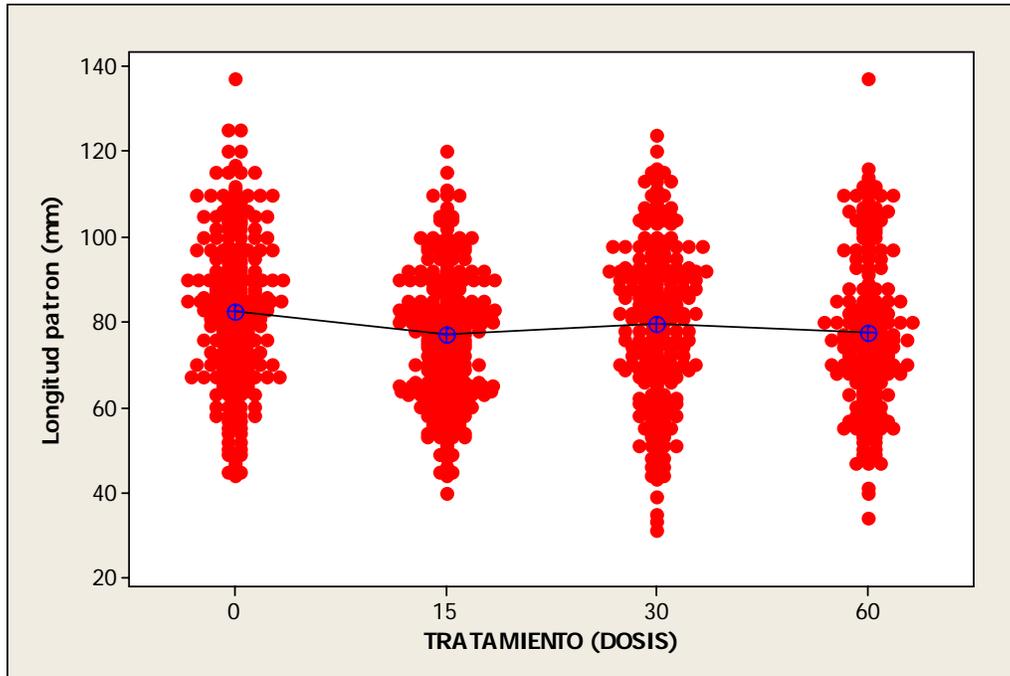


Figura 28. Dispersión de datos de la longitud patrón por tratamiento de ejemplares de la cabrilla arenera durante el experimento.

Aunque en casos particulares, como los mostrados en las figuras 20 y 21, en donde se observan diferencias significativas para ciertos meses (aunque estas diferencias ya no se observan en los meses consecutivos), de manera general estas diferencias no se presentaron al analizar la totalidad de los datos en la relación peso-longitud. En la figura 29 se muestra la correlación de este análisis y se nota una correlación muy alta (94 %). Esto mismo se ve en la figura 30, donde en la relación peso-longitud se observa un crecimiento exponencial muy similar entre todos los tratamientos. Esto nos indica que el crecimiento no se vio afectado por algún tratamiento.

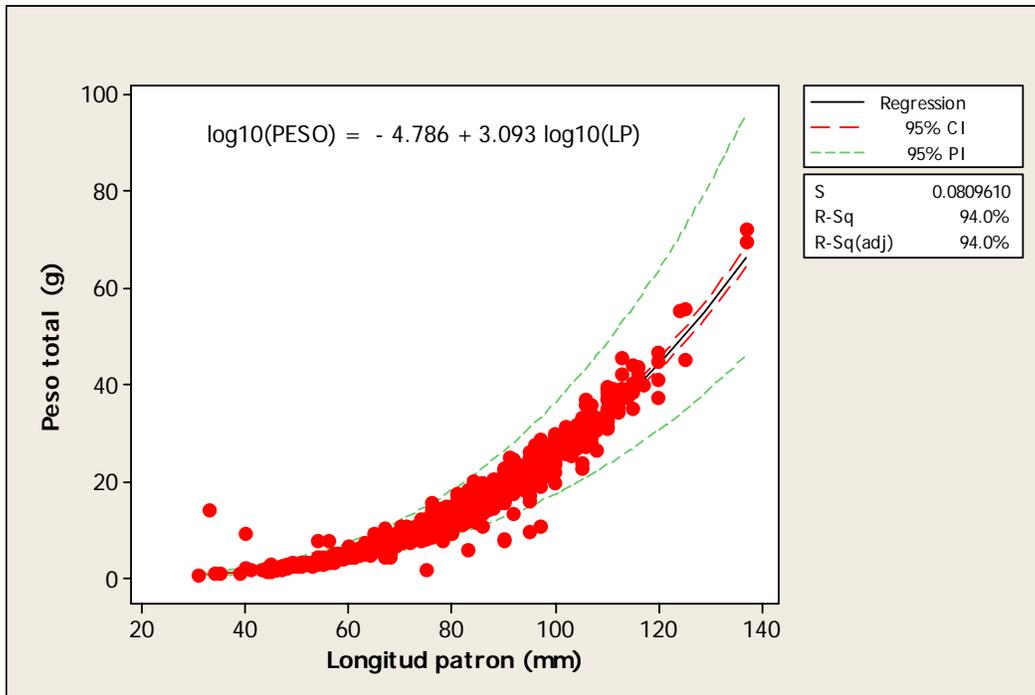


Figura 29. Índice de correlación de individuos de la cabrilla arenera (todas las biometrías mensuales y tratamientos).

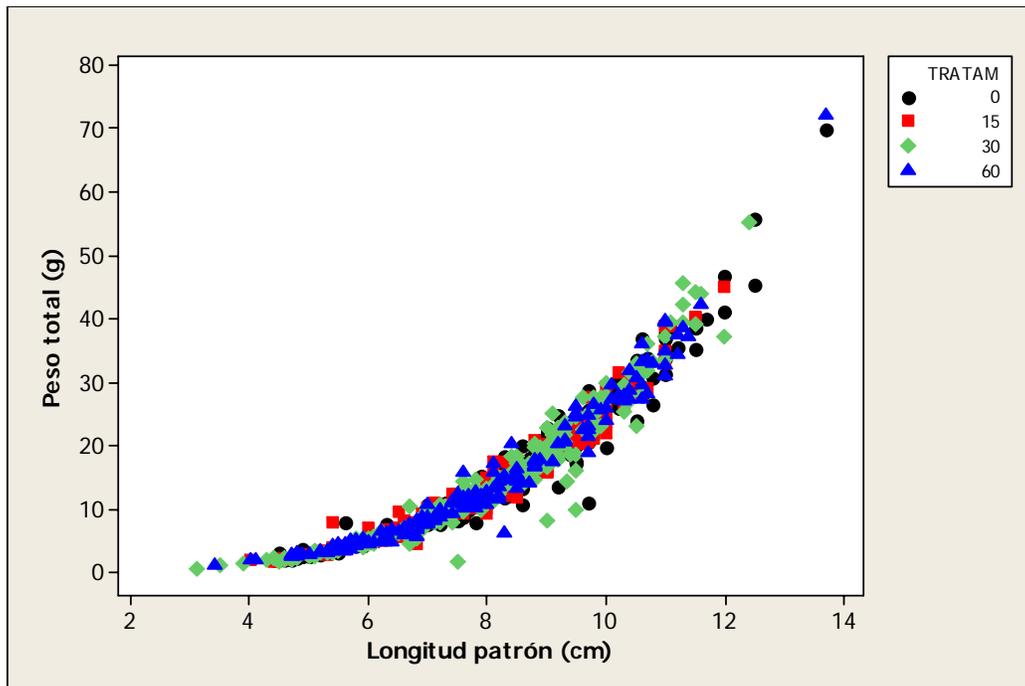


Figura 30. Relación peso-longitud por tratamientos del día 30 al 297 DE, de la cabrilla arenera.

En cuanto al factor de condición, no mostró diferencia significativa. Los valores fueron similares entre los tratamientos, e incluso a lo largo del tiempo (Tabla 16).

Tabla16. Relación del Factor de Condición, se presentan los valores promedios.

Factor de condición (promedios)				
	Control	15 mg	30 mg	60 mg
Agosto	2.30	2.38	2.36	2.38
Septiembre	2.39	2.55	2.60	2.58
Octubre	2.62	2.58	2.45	3.09
Noviembre	2.55	2.38	2.40	2.51
Diciembre	2.64	2.52	2.68	2.65
Enero	2.43	2.50	2.54	2.40

Los valores del índice gonadosomático de cabrilla arenera al día 300 DE, mostraron una marcada diferencia entre los peces provenientes del grupo control y los ejemplares provenientes de los tratamientos hormonales ($p < 0.05$; Figura 31).

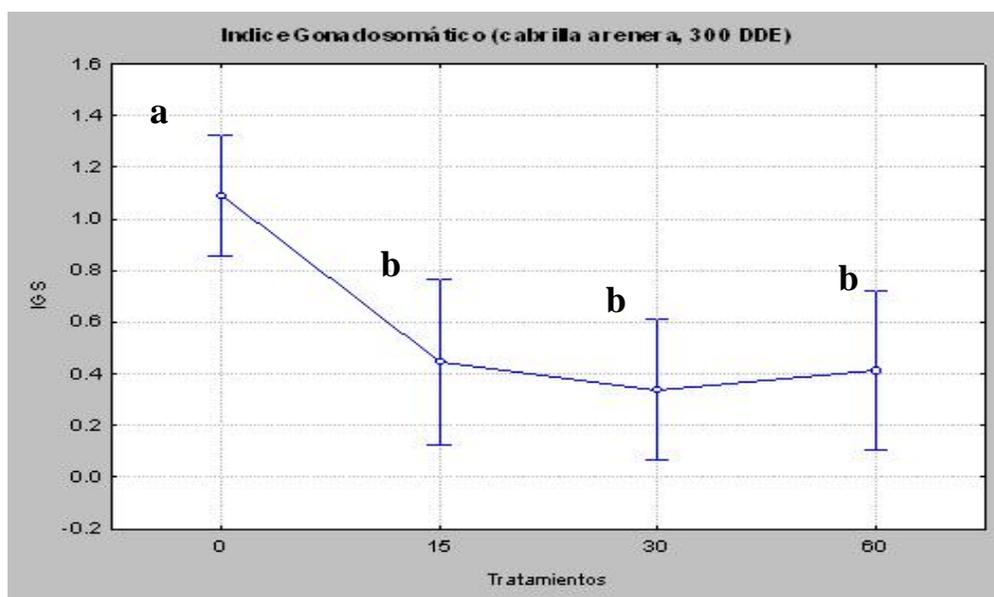


Figura 31. Valores promedio del Índice Gonadosomático (\pm IC). Letras desiguales indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

El grupo control presentó los valores más altos y es de notarse que en ningún caso los valores de los peces control se traslaparon con los valores de los peces de los tratamientos, quedando estos últimos siempre por debajo. Por otra parte, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con

esteroide,, mostrándose incluso como replicas entre ellos mismos ya que los resultados fueron similares.

El análisis de los datos del Índice Hepatosomático, indicó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el control y los tratamientos con 17 MT. En este caso los valores más bajos fueron encontrados en los peces control (Figura 32). Esto muestra coherencia con el IGS, ya que inversamente se esperaba encontrar los valores menores del IGS.

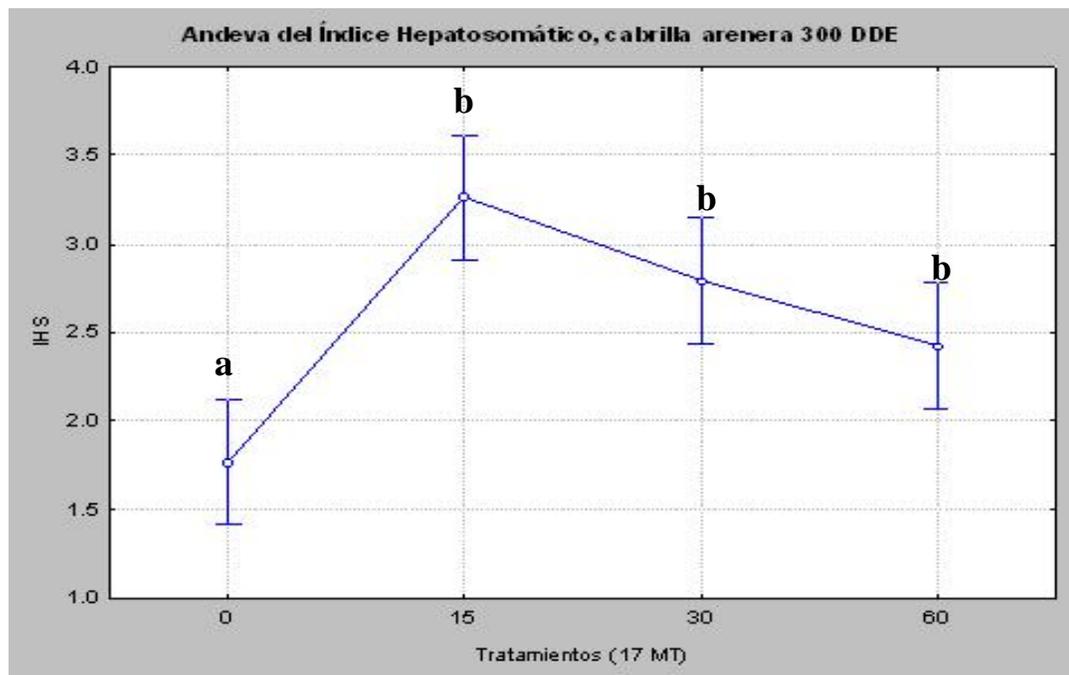


Figura 32. Valores promedio del Índice hepatosomático (\pm IC). Letras desiguales indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7. 8. Determinación cuantitativa de la 17 MT en el sistema de larvicultivo.

Al evaluar la efectividad del sistema de Luz Ultravioleta para eliminar la 17 MT del sistema de larvicultivo, de las muestras obtenidas, se seleccionó el agua de tanques control (T2 y T4, presumiblemente libre de 17 MT) y agua de la cisterna, donde se mezclan el agua de todos los tanques, incluyendo restos de alimento (se cree que esta sería el agua con mayor residuo de 17 MT).

Al realizar los análisis en el HPLC, no se encontraron indicios de 17 MT en ninguno de los casos analizados, en la figura 33 se muestra lo observado para el agua de la cisterna (agua con más residuos). El límite de detección mínima del método es 0.1 µg (eq. 100 ng) (Figura 34).

En todos los casos ensayados, la 17 MT mostró un tiempo de retención promedio de 17.38 minutos. Esta, como ya se mencionó, no se pudo apreciar en forma clara en las muestras analizadas de los residuos y considerando el límite de detección señalado anteriormente, alguna posible actividad queda por debajo de este límite, por lo cual se determina que no hay indicios de la presencia de esta hormona en el agua del sistema de larvicultivo (SC-18)

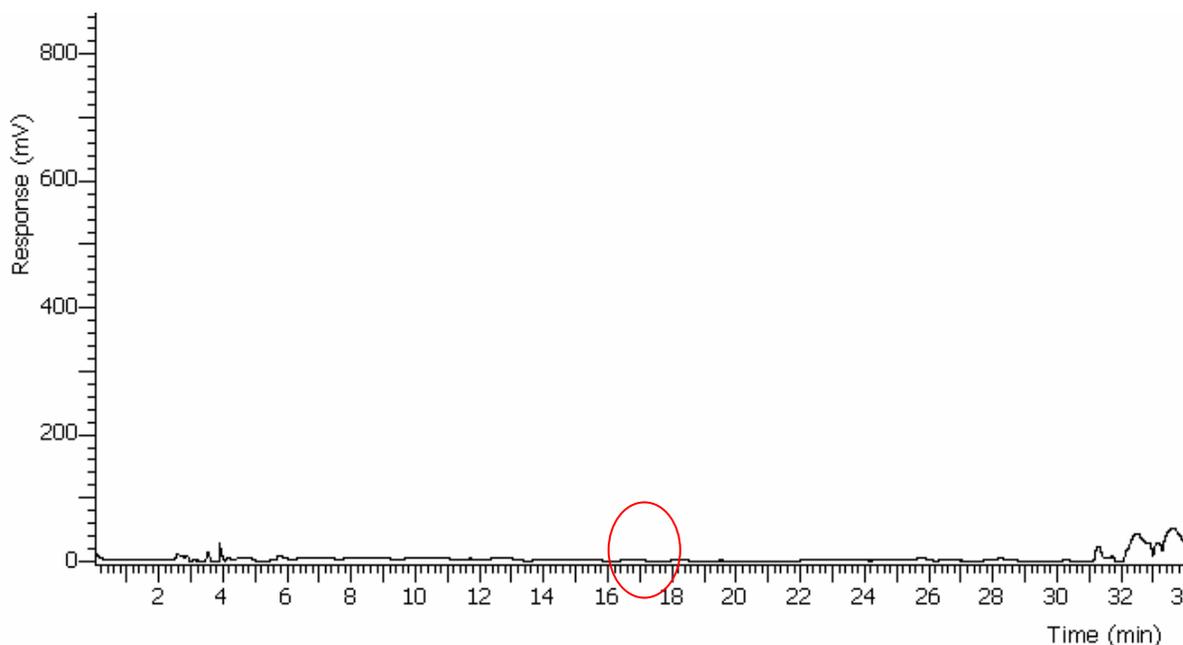


Figura 33. Gráfica de la detección de 17 MT en el agua de la cisterna, el círculo señala la posición (17 min.) donde debería detectarse la presencia de la 17 MT.

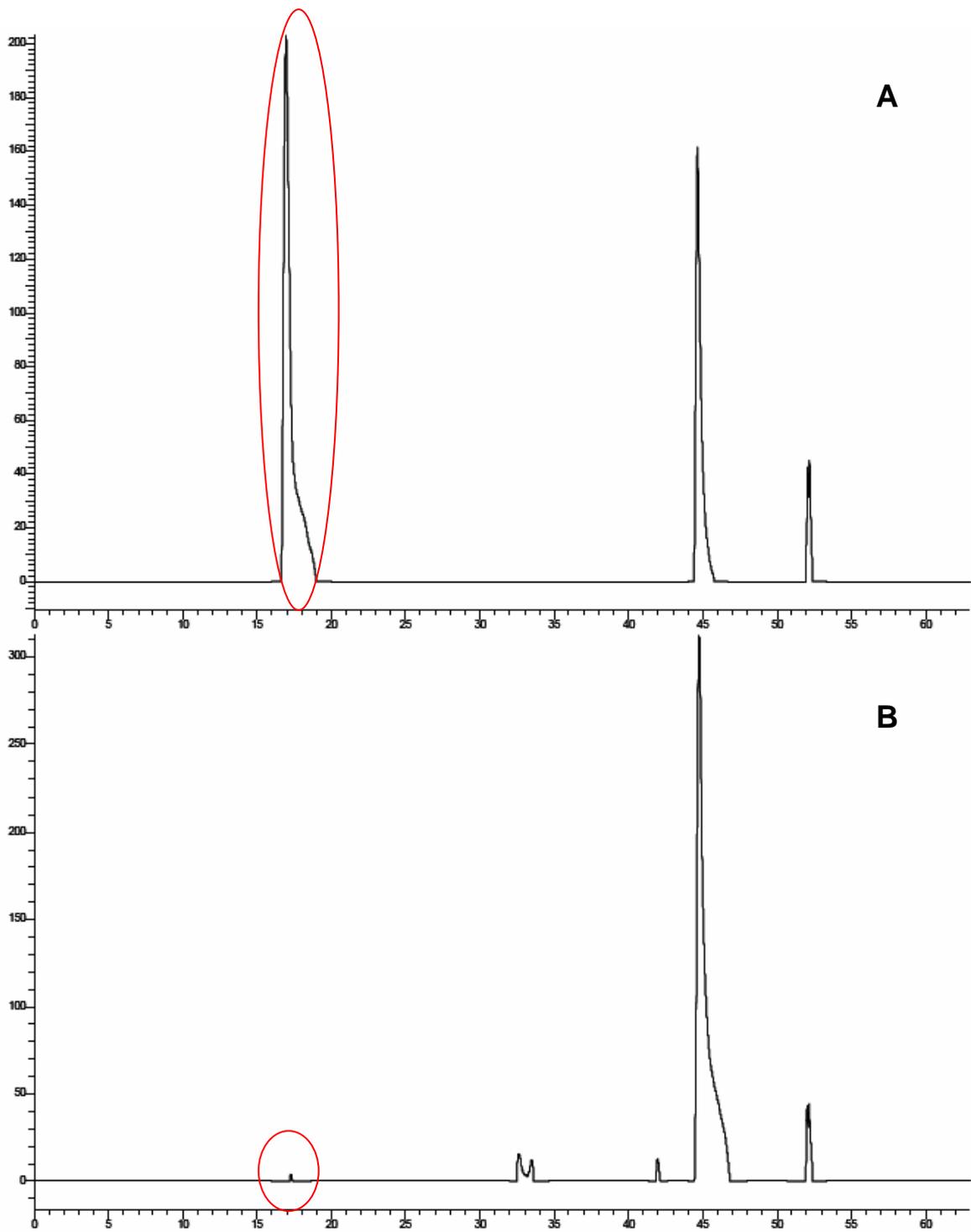


Figura 34. Se muestran los cromatogramas de la 17 MT a 1 μg (A) y 0.1 μg (B). Se observa que el pico alrededor de los 17 minutos (ovalo rojo) decrece cuantitativamente con la concentración de la 17 MT. El resto de picos son atribuibles a impurezas del disolvente (etanol).

7.9. Cuantificación de ARNm codificante para aromatasa en la cabrilla arenera.

Realizada la extracción del ARN, retrotranscripción y amplificación del DNA de los juveniles de cabrilla examinados, se procedió a la lectura de las bandas de expresión en los geles de agarosa.

A partir del día 81 DDE (muestreo 7) solo se extrajo una réplica por tratamiento, debido a que el peso de las muestras superaba los 100 mg de tejido, obteniéndose en varios casos hasta 5 submuestras.

Tabla 20. Rotulación y control de las muestras de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) a las que se le realizó la extracción de ARN y la retrotranscripción según el día de muestreo.

MUESTREO	FECHA		EDAD (DDE)	NÚMERO DE TANQUE												
	DÍA	MES		1	2	4	5	6	7	8	11	12	13	16	17	
1	01	Mayo	39	1	2	4	5	6	7	8	11	12	13	16	17	
2	08	Mayo	46	1	2	4	5	6A	6B	8	11	12	14	16	17	
3	15	Mayo	53	1	2	4	5	6	7	8	11	12	13	16	17	
4	22	Mayo	60	1	2	4	5	6	7	8	11	12	13	15	16	
5	29	Mayo	67	1	2	4	5	6	7	8	11	12	13	15	16	
6	06	Junio	74	1	2	4	5	6	7	8	11	12	13	16	17	
7	12	Junio	81	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
8	19	Junio	88	1	2	4	5	6	7	8	11	12	13	16	17	
9	26	Junio	95	1	2	3	4	5	6		7	9	10	11	12	
10	03	Julio	102	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
11	10	Julio	109	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

En la fotodocumentación de los geles, se observó la presencia de la banda correspondiente a la aromatasa en las muestras analizadas,. El fragmento amplificado de la aromatasa posee 239 pares de bases como se muestra en el gel de la Figura 35, y que posteriormente fue confirmada por su secuenciación. A lo largo de las semanas de muestreo (del día 46 al 109 DDE), es posible detectar la expresión por medio de esta técnica.

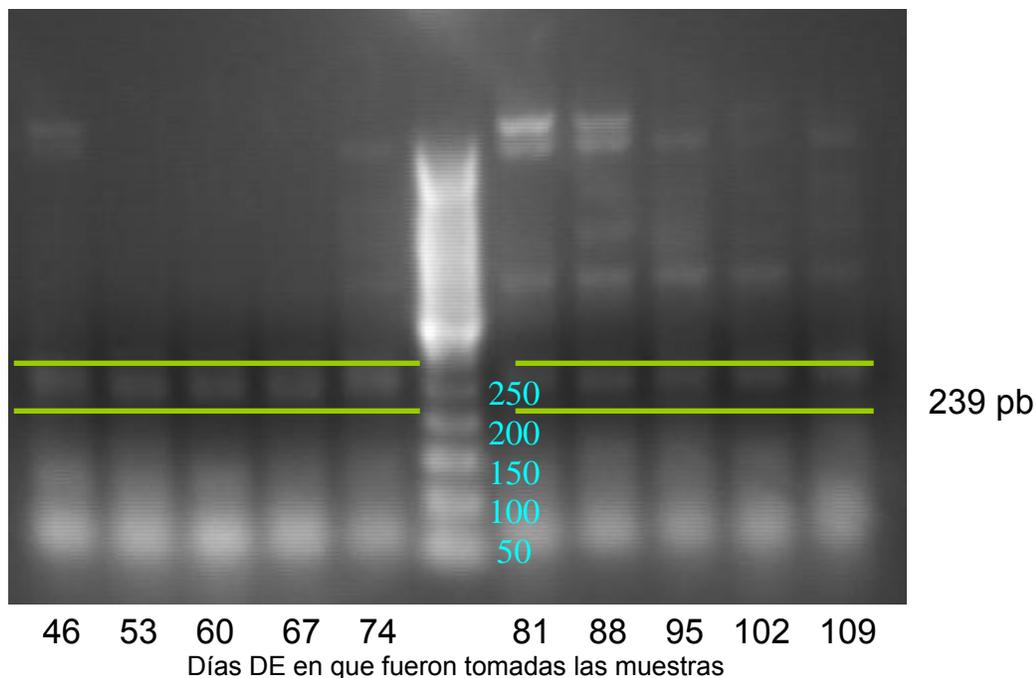


Figura 35. Se aprecia la expresión de la aromatasa (tanque 1) reflejada en 239 pares de bases (se aprecia entre las líneas paralelas de color verde).

Secuenciación del fragmento obtenido por PCR para aromatasa.

El fragmento amplificado por PCR (239 pb) dio como resultado la siguiente secuencia:

```

AGCTCCTGGGCTGCTGTCTTGTGCCTCTGGTGAATCCAGTCAAACCTTGAAGTA
AATGTCTGGTTTGATGAGCACAGTCTGCCACGTGTCAAATACTTCTGAATCTT
CAGCAGCAGCTCTTTTTCATCGACAGGTACATCCAGGAAAAGTCTGTTTGAGA
TGTCGACCACGGTGCAGCGCAGCAAACCTGAGAACATCCACATGACCCAAACT
GCCCAGGTCGTCCAGGTGAGTCTGTGT

```

La secuencia consta de 239 pares de bases y tiene un alto nivel de homología con las bases de datos registradas en Genbank: 94% con *Perca flavescens*, 93% con *Dicentrarchus labrax* y 92% con *Lates calcarifer*. El número de registro en Genbank es FJ232065.

Las Figuras 36 y 37 muestran las curvas construidas para la cuantificación de la aromatasa en relación al gen 18S.

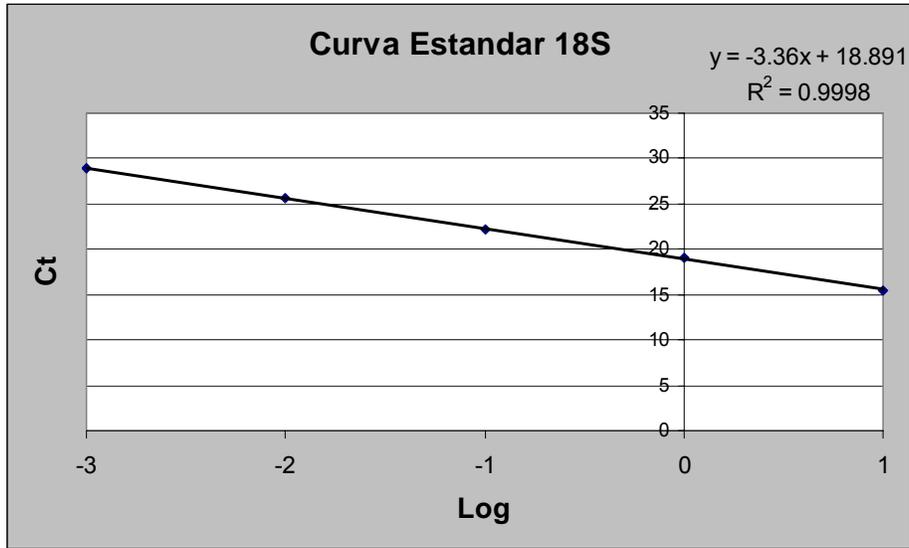


Figura 36. Curva estándar 18S, para calibrar la expresión del gen que codifica la aromatasa.

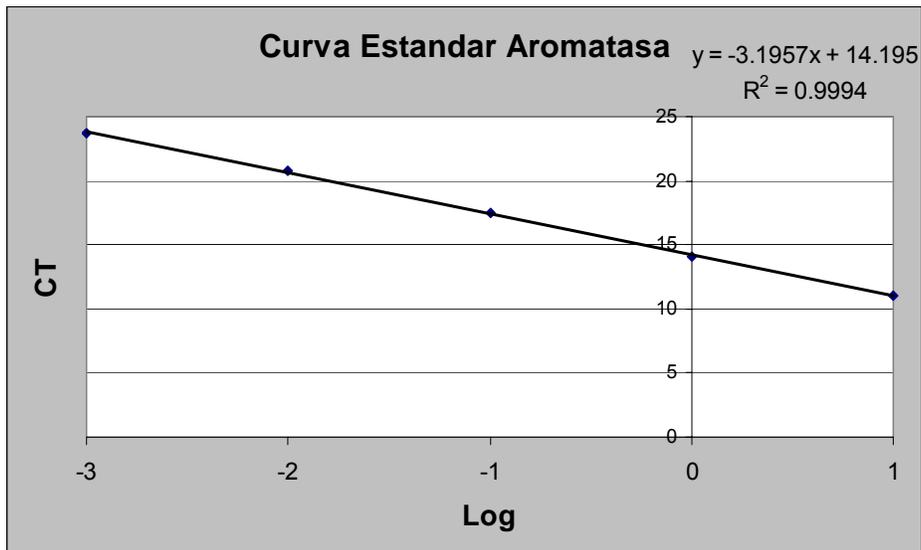


Figura 37. Curva estándar de la aromatasa.

Los niveles de expresión de la aromatasa tuvieron su mayor expresión en el día 39 DE, en los peces del tratamiento 30 MT (Figura 368 C). En las semanas posteriores, se observó una disminución en este mismo tratamiento. A excepción del primer valor encontrado en el día 39 DE, el resto de los valores en todos los tratamientos representan valores muy similares. Esto tiene relación con los valores encontrados en los análisis histológicos, en los que se observa únicamente la presencia de gónadas masculinas.

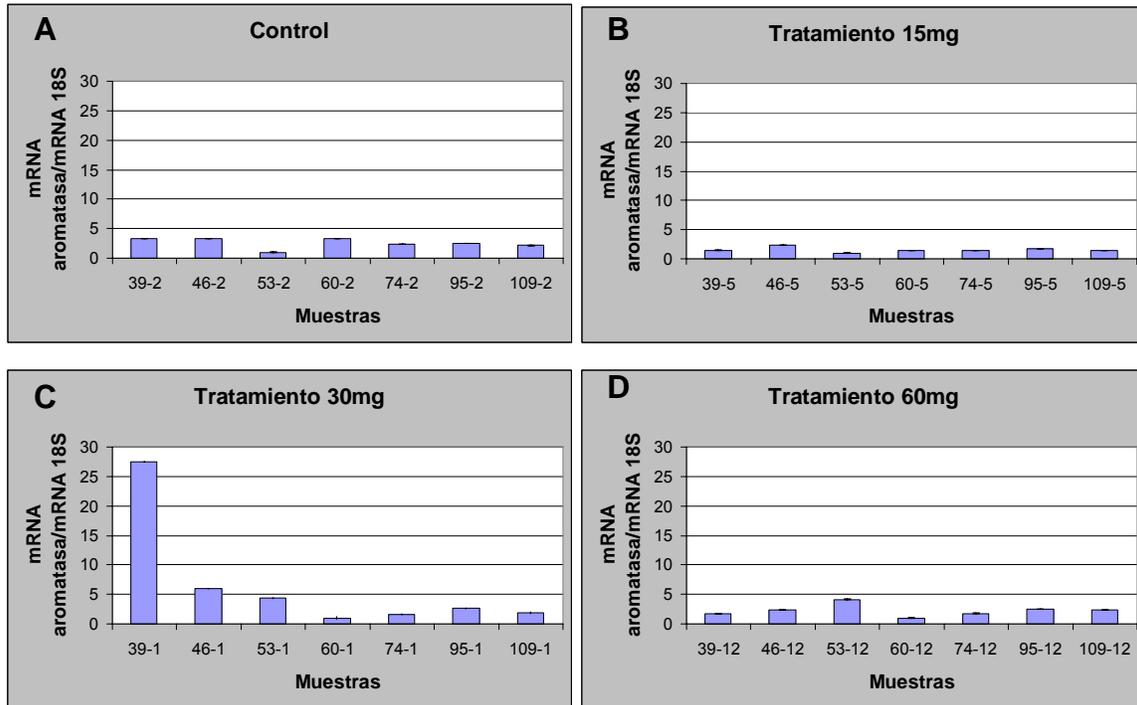


Figura 38. Se muestran en A, B, C y D, la expresión de la aromatasa en los diferentes tratamientos incluido el grupo control.

8. Discusión

8.1. Predicción del periodo lábil en la cabrilla arenera

Con las muestras analizadas previamente al desarrollo del experimento con la 17 MT, permitieron predecir el momento en el cual deberían de iniciarse los tratamientos.

De las muestras correspondientes al día 30 DE, a las cuales se les practicó análisis histológico, efectivamente, se tuvo la certeza de que el inicio del experimento correspondió a un tiempo en el cual aún no se iniciaba la diferenciación sexual. Incluso en las muestras analizadas fueron difíciles de detectar las células germinativas o gonias, su ubicación estuvo en relación a la posición que mantuvieron, con respecto a la cercanía de ciertos órganos, por ejemplo el riñón, al cual estaba anatómicamente próximo al tejido germinativo (Smith, 1965).

Este momento fue sumamente importante, debido a que de este modo la causa absoluta en cuanto a la diferenciación sexual se le puede atribuir a la acción de la 17 MT. Además los análisis mediante el uso del HPLC hechos para detectar la presencia del la 17 MT. Dieron la garantía de que la hormona estaba presente en el alimento. Estos datos, inicialmente nos arrojaron el hecho de que se pudo separar la hormona pura para ubicarla como referencia y tener un patrón de comparación al realizar los siguientes análisis del alimento en las diferentes concentraciones con la 17 MT.

8.2. Captura y acondicionamiento de reproductores

Para plantear experimentos con larvas y juveniles de peces, es importante conocer la historia de vida de la especie lo mejor posible. Es importante establecer criterios que desde el inicio permitan obtener y seleccionar un buen lote de reproductores y consecuentemente lograr semilla de calidad.

Uno de estos criterios para escoger un buen lote de reproductores está en relación con la edad de los individuos. Es sabido que reproductores extremadamente jóvenes o en senectud no son convenientes. Considerando la precocidad de la cabrilla arenera, en la cual se han reportado hembras maduras en el medio natural a los 92 mm (Hastings, 1989) y debido a la talla máxima reportada de 559 mm (Miller y Lea, 1972); los reproductores utilizados en el presente experimento se encuentran dentro de un intervalo de edad y tamaño adecuado, no son tan jóvenes y tampoco han llegado a una edad en la cual se pueda manifestar un desgaste reproductivo.

Por otra parte, refiriéndonos al historial de los reproductores mientras permanecieron en cautiverio, se registró un incremento en los desoves obtenidos, lo que también nos indica que los adultos reproductores se encontraban en recuperación, después de haber pasado el periodo de estrés inherente a la captura y al mantenimiento en cautiverio. El desempeño en cuanto a los desoves confirmó, de hecho, el buen estado y aclimatación adecuada de los peces, lo cual estuvo reflejado en el incremento en el volumen de las puestas.

El desove utilizado en el experimento también fue evaluado para tener un punto de vista más objetivo en cuanto a la calidad del mismo. La evaluación de parámetros analizados con relación al porcentaje de eclosión y al estrés osmótico (Martínez-Brown, 2007), arrojó datos confiables para utilizar el desove de calidad, y proceder en el experimento con la certeza de tener un buen material.

8. 3. Cría larvaria de la cabrilla arenera

La cría larvaria se desarrolló sin mayores inconvenientes; los resultados obtenidos en el crecimiento fueron comparables a los obtenidos en experimentos anteriores (Álvarez-González, 1999; Gallegos-Sánchez, 2007). Una diferencia entre los trabajos mencionados fue el tiempo de inicio de la coalimentación, al día 25 DE. Según los datos mencionados por Peña-Martínez (2004) y Álvarez-González

(2003), tanto la madurez anatómica del tracto digestivo como la presencia de enzimas ocurren a los días 18 y 21 DE. Por lo cual, haber iniciado la coalimentación al día 25 DE fue conveniente, incluso, se anticipó 5 días previos, y puesto que, el objetivo del trabajo no era ese, se mantuvo una posición un tanto conservadora. La única intención de adelantar la coalimentación al día 25 DE, fue para que al inicio de los tratamientos con alimento inerte, se administrara la ración total de alimento inerte enriquecida con el esteroide 17 MT.

Como una evidencia para trabajos futuros, el día 30 DE, durante la resiembra y distribución para iniciar con los tratamientos, se pudo apreciar una tonalidad oscura en la piel de una tercera parte de la población de los peces estudiados. Particularmente, este tipo de observaciones son importantes debido a que en experimentos anteriores no existen registros de este tipo, aunque de ningún modo significa que no se hayan presentado. La explicación a esa tonalidad puede darse por el estrés que sufren durante la transformación a juveniles, debido a que la tonalidad oscura desapareció 2 o 3 días después, cuando, cronológicamente la transición a juvenil concluyó (Ortiz-Galindo, 1999).

En el período larvario, la supervivencia fue del 8 %, un porcentaje aceptable, sin ser el alcanzado al 11% reportado por Álvarez-González (1999). Para los fines del presente trabajo, esta condición permitió tener un número adecuado de organismos para los experimentos planteados. Este porcentaje, además de las pruebas de calidad practicadas al desove, corroboró que los peces utilizados se encontraban en buen estado.

8. 4. Enriquecimiento del alimento inerte con 17 MT

Es necesario hacer notar que de acuerdo a los análisis de HPLC, la validación de las cantidades usadas, correspondió a cantidades menores de las concentraciones propuestas. Aunque esto se diagnosticó solo para las concentraciones de 30 y 60 MT, no así para la de 15 MT. En estos casos, la

lectura de concentraciones menores fue atribuida a que se desprecia una cierta cantidad bajo la curva, debido a que el área fue determinada sólo por apreciación visual directa. De esta manera, correspondió a un error humano, y no se debió a un error en el procedimiento para enriquecer el alimento inerte con 17 MT. Además, se debe señalar que los resultados no se vieron influenciados por efecto de las concentraciones, en consideración a que, evidentemente todas las dosis fueron excesivas y afectaron de manera similar tanto en el crecimiento como en el desarrollo de la gónada.

Para garantizar el efecto de la hormona, esta debe de permanecer en un periodo no mayor a tres meses, según Popma y Green (1999). En el caso del experimento realizado, el alimento se preparó con una periodicidad de 10 días, de este modo se pudo tener la certeza de que el alimento estuvo enriquecido con la 17 MT. Con todo esto, no queda la menor duda de que el efecto de la hormona fue de manera efectiva para conseguir los objetivos propuestos.

8. 5. Determinación del efecto de administración dosis y tiempo de la 17 MT en la masculinización de la cabrilla arenera

Al analizar la dosis y el tiempo en que actuó la 17 MT, según los resultados encontrados, desde el primer mes se observó el efecto de la hormona en la diferenciación sexual.

La cabrilla arenera es una especie hermafrodita protogínica (Hastings, 1989; Ocampo-Cervantes, 2002) y, por esta condición, debiera esperarse se diferenciara primeramente como hembras, a nivel individual y poblacional. En particular, este fenómeno debió haberse observado en los peces del grupo control; sin embargo, esto no fue así. La evidencia encontrada por los análisis histológicos indicó que desde el primer mes de tratamiento, en todos los casos se detectó la diferenciación sexual hacia macho. La condición protogínica de esta especie es clara, evidenciada en trabajos de campo y laboratorio (Hastings, 1989; Oda *et al.*,

1993; Ocampo-Cervantes, 2002; Sánchez-Gallegos, 2007), además del registro de colectas de campo realizadas en los últimos 18 años (datos no publicados), en los cuales no se ha observado la presencia de machos en longitudes menores a 130 mm; incluidos los ejemplares recolectados en el campo durante el presente estudio. Para definir el periodo lábil, en todos los casos solo hubo gónadas femeninas inmaduras (L.P. con un intervalo de 43 a 74 mm).

En la tabla 18, se compara información de trabajos de otros autores en campo y laboratorio, en ellos queda de manifiesto la condición protogínica de la cabrilla arenosa. Se compara del mismo modo, la LP, mínima de un ejemplar del presente trabajo, en el que tuvo el efecto contundente de la hormona en la diferenciación sexual.

Tabla 18. Comparación de eventos de la diferenciación sexual con respecto a la longitud (mm) en *P. maculatofasciatus*.

	Células germinales	Hembra inmadura (intervalo, L.P.)		Hembra madura	Presencia de macho
Hastings, 1989 (estudio de campo)		43		92	102
Sánchez-Gallegos, 2007 (experimento en laboratorio)	10.4	45.9	97.2*		
Estudio de campo (este trabajo)	18	43	74		
Experimento en laboratorio (este trabajo)	10.7	27.4			

Es también conveniente hacer notar la precocidad reproductiva de la especie evidenciada en la presencia de un macho con actividad espermática a una L.P. de estas dimensiones. La evidencia de la condición precoz se refiere la potencia de la 17 MT para producir la masculinización, además del efecto en la maduración.

Información adicional, derivada del reporte de la precocidad, en la presencia de machos maduros en esta especie, con relación a que las especies hermafroditas, requieren concentraciones mínimas (alrededor de 1 mg/kg) para ser inducidas a la inversión sexual.

Al finalizar el primer mes de experimentación (60 DDE), el análisis histológico de las gónadas en algunas muestras (perteneciente a ejemplares sometidos a tratamientos con 17 MT), al final del primer intervalo de tiempo probado (30 días), resultó complicado debido a la escasez de estructuras que indicaran la presencia de células germinativas o de estructuras que podrían derivar en gónadas. Puesto que el resultado se repitió durante los siguientes dos muestreos, correspondientes a 60 y 90 días del suministro de la 17 MT. El resultado histológico en las muestras al término de los tiempos establecidos, produjo interrogantes, debido a la ausencia de estructuras indicadoras de la presencia de gónadas. La explicación en la ausencia de este tipo de estructuras al finalizar el experimento fue evidente en las muestras de los 297 DDE. En el análisis de las muestras del final en presente trabajo, demostró que en el 40 y 50 % de los peces sometidos a los tratamientos con el esteroide, no desarrollaron las gónada (n=30 /cada tratamiento).

Por ser un trabajo pionero en la cabrilla arenera no se sabía con exactitud, antes de iniciar este estudio, lo que pasaría con el uso del la 17 MT; se consideraron varios supuestos sin ninguna seguridad de cual resultaría. Una de las posibilidades fue el efecto del esteroide en la malformación de la gónada, como consecuencia del suministro excesivo del esteroide. En otras especies como *Dicentrarchus labrax*, Chatain *et al.* (1999), reportaron deformidades en el desarrollo de la gónada masculina, por uso de la 17 MT (5 mg/kg en 90 días de uso), aunque en un porcentaje menor (10 %). Sathyanarayana y Satyanarayana (1983) en la carpa *Cyprinus carpio var. communis* (Linnaeus), encontraron un mayor porcentaje de esterilización (54 %), con concentraciones mayores del esteroide (200 mg/kg en 131 días de administración).

Otro supuesto esperado en los resultados de este estudio, se refería a la feminización paradójica, observada por exceso de la administración de la 17 MT. Como en el caso de la trucha arcoíris (*Salmo gairdneri* Richardson), en donde Solar *et al.* (1984) reportan el dato en dosis entre 50 y 100 mg/kg (en un tiempo de 120 días de administración). Esto no fue así, se explica porque no se presentó la feminización paradójica, contraria al hecho de la masculinización en los grupos control.

Cuando se diseñó el presente experimento, un argumento para eliminar la 17 MT fue el uso de un sistema de luz ultravioleta (LUV); puesto que efectivamente la LUV elimina la 17 MT y la hace indetectable para el HPLC y para el RIA (Schreck *et al.*, 2005). Aunque, por actividad biológica se ha detectado el producto de la descomposición de la 17 MT. Se producen metabolitos que pueden ser tan potentes o más que la 17 MT (Abucay y Mair, 1997). Esto fue observado en sistemas de recirculación; se demostró que el alimento consumido al pasar por el hígado, activa metabolitos que son excretados con la bilis. Es probable que la masculinización de los peces control se debiera a una filtración de metabolitos capaces de masculinizar la cabrilla arenosa. Por otra parte, la cantidad filtrada no fue excesiva, puesto que el resultado fue machos funcionales con gónadas bien desarrolladas (comprobándose al presionar el vientre y obtener semen), a diferencia de los peces tratados con la 17 MT, en los cuales las gónadas estuvieron atrofiadas y ausentes.

Si bien es discutible el hecho de encontrarse una sola hembra en el experimento al día 95 DE, con el tratamiento 30 MT, la diferenciación a machos en el resto de grupos sometidos al esteroide, aparentemente, está en contradicción con la condición protógina de la especie. Tomando en consideración lo anterior podrían plantearse dos aseveraciones:

- El esteroide empleado en los tratamientos se fugó al agua del sistema de recirculación, masculinizando a los peces del grupo control.

- La condición protogónica de la especie en cuestión es eventual, o no se presenta en ciertas condiciones.

La evidencia en la condición protogónica de la cabrilla arenosa, no está en duda, entonces, la posibilidad de la fuga del esteroide en el sistema hasta llegar a los tanques control, es una opción que explica el resultado del 100 % de machos.

8. 6. Desarrollo gonadal por efecto del suministro de la 17 MT

En un análisis más detallado y retomándose lo expresado por otros autores, uno de los propósitos al suministrar esteroides en exceso es producir esterilidad, como en *Cyprinus carpio* var. *communis* (Sathyanarayana y Sathyanarayana, 1983; Solar *et al.*, 1984). Después de comparar la ausencia de gónada en los peces sometidos a los tratamientos con la 17 MT (40-50 % de ausencia de gónada) y de la presencia de la misma, en los peces control (100 %), es notable el contraste entre los peces de estas dos procedencias. Esto último, es una evidencia de la influencia de la 17 MT; además tuvo como consecuencia el producir esterilidad, por efecto del suministro en exceso.

Analizándose lo anterior, se puede asumir la manera en que la 17 MT empieza a mostrar su efecto, es una evidencia clara en cuanto a la esterilidad. Si se considera que el porcentaje incrementó al sumarse las gónadas que tuvieron un desarrollo limitado, inclusive aquellas gónadas malformadas; entre las que resaltan formas de rosario, tipos cúbicos y algunas otras en forma de gotita. En caso de las gónadas con estas deformaciones, se existe duda de su funcionalidad, ya que, además no se identificó la presencia de un conducto definido que permitiera la expulsión de los gametos al exterior. Esta misma carencia de conductos es señalada por Feist *et al.* (1995) para la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Un reflejo de este desarrollo escaso o subdesarrollo de la gónada, queda claro considerándose los valores obtenidos del índice gonadosomático (IGS). Aquí, la

diferencia significativa observada, es una prueba del efecto de la 17 MT. Blázquez *et al.* (1995), hace mención de esto mismo para *Dicentrarchus labrax* (concentraciones de 10 mg/kg en 100 días de exposición), en donde también se puso en evidencia un valor menor del IGS en peces tratados con 17 MT. Valores altos de IGS son indicio de gónadas mejor desarrolladas, y eso precisamente es lo que se observó en el presente estudio.

Al revisar la bibliografía generada en el tema, no aclaraba cuánto podría ser la concentración de 17MT, para lograr el 100 % de esterilidad. En el presente estudio, en los tres tratamientos con 17 MT (15, 30 y 60 mg/Kg) se obtuvo un 100 % de esterilidad; tomando en cuenta que la diferencia en el desarrollo de las gónadas encontradas en estos tratamientos fue notable con respecto a lo observado en las gónadas de los peces control. Aunque es probable, que en trabajos posteriores se deba hacer otro tipo de estudios con el objetivo de demostrar la funcionalidad del sistema reproductor de los peces tratados con 17 MT.

Otro efecto reportado en estudios donde se ha empleado 17 MT es la feminización paradójica, ocasionada en teoría por una dosis excesiva del esteroide. (Solar *et al.*, 1984). El exceso del esteroide provoca que la enzima aromatasa actúe transformando el excedente de andrógeno, en estrógeno, lo que traería como consecuencia una reversión de sexo de macho a hembra. Este tipo de feminización es difícil que se pueda presentar, puesto que la especie empleada, en teoría es 100% hembra, durante sus primeros meses de vida (Sánchez-Gallegos, 2007) y no existe ningún reporte de hembras transformadas en machos, una vez que la reversión natural ocurre en una especie protogínica.

De las muestras tomadas el día 95 DDE, para dar seguimiento de la actividad de la enzima aromatasa, en la disección uno de los peces, mostró una estructura anatómicamente de forma tubular y tonalidad rosada, presumiblemente representó a la gónada femenina. Sería el único caso de la presencia de una hembra dentro del grupo control y el segundo reporte de alguna hembra, al día 39 DE, según la

gráfica de expresión de aromatasa, para el tratamiento 30 MT, se observa una lectura que podría ser evidencia de una hembra dada la diferencia entre el resto de los datos.

Al referirnos a la premisa para determinar la dosis y tiempo más adecuado, para lograr la masculinización de la cabrilla arenosa; de acuerdo con los resultados del experimento el tratamiento con la dosis y tiempo menores; fueron excesivos; con 15 mg/kg, aplicada en un periodo de 30 días. De tal manera que los resultados obtenidos en cuanto a la masculinización no fueron los esperados. Con respecto al objetivo general de la investigación, para inhibir la reproducción, los resultados fueron los esperados, en consideración que la esterilidad impide la reproducción en cualquier especie y este fue el caso para *P. maculatofasciatus*.

No deja de llamar la atención el hecho de que una especie hermafrodita protogónica, en condiciones de cautiverio, no presente desarrolladas gónadas femeninas. Se sabe por otros autores (Beardmore *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2000; Piferrer, 2001; Wang y Tsai, 2006; Zanuy *et al.*, 1995) que algunas variables ambientales, pueden influir en la diferenciación hacia alguno de los dos sexos, aunque para *P. maculatofasciatus* no se tiene conocimiento de esta condición. Entre las variables con mayor influencia en la determinación y diferenciación sexual son la temperatura y el fotoperiodo. Una característica en común con el estudio realizado por Álvarez-González (1999), fue la diferencia en la temperatura, en ambos experimentos a 25 °C. A partir de ese experimento esta temperatura ha sido empleada rutinariamente para el periodo de larvicultura. Este dato solo nos permite tomarlo como base para experimentos posteriores, en aquello que pretenda demostrar la influencia de la temperatura en la determinación del sexo. Por lo pronto, ante la carencia de más información al respecto, aunque no se descarta, tampoco se puede afirmar que esa sea la razón por la cual se obtuvo el 100 % de masculinización en los controles.

Los machos al diferenciarse sexualmente en su primera madurez, en especies hermafroditas del tipo protogónico, son denominados machos primarios (Sadovy y

Shapiro, 1987), la razón de esto no es clara, podría deberse a comportamientos sociales relacionados con la densidad de población. Ramos *et al.* (2002), encuentran para *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) que la manipulación del fotoperiodo puede atrasar o adelantar la primera maduración. Este tipo de estudios tampoco se han realizado en la cabrilla arenera y retomando lo mencionado por Ramos *et al.* (2002), resalta también el hecho de que al día 60 DE, al examinar las muestras histológicas correspondientes al fin del primer mes de tratamientos, se observaron machos con actividad espermática.

El fotoperiodo utilizado en el presente experimento fue de 14:10 (luz:oscuridad) y se mantuvo constante desde el día 0 hasta el día 120 DE (después de este día se pasaron a otro sistema de cultivo). Como se señala en el párrafo anterior, hace falta probar más los efectos de distintos fotoperiodos para poder estimar el tiempo en que se presenta la primera madurez.

Al analizar la causa por la cual se masculinizaron los peces control y al considerar la precocidad característica de la especie, parece en primera instancia, que la 17 MT tuvo la principal responsabilidad y parecería tener concordancia. Aunque al tener en cuenta con prioridad el efecto tan marcado de la 17 MT, tanto en la ausencia de gónadas como en el índice gonadosomático, entonces, no se explica claramente el efecto de la hormona aplicada.

Por otra parte, aunque no hay pruebas, podría ser que la cantidad de hormona para masculinizar la cabrilla arenera, y efecto simultáneo de acelerar su maduración sea tan mínima, que no sea detectada por el HPLC, posiblemente sea esta cantidad tan reducida. O bien, solo un detonante que combinado con las variables ambientales manejadas, favorezcan los resultados ya mencionados. Quizás, también en esta consideración y tomando en cuenta la esterilidad y el subdesarrollo de las gónadas en los peces tratados con 17 MT, podría determinarse que todas las concentraciones usadas fueron excesivas, adecuadas para causar esterilidad; aunque no lo suficientes como para provocar la feminización paradójica.

Se debe considerar que no existen reportes de ningún caso de reversión sexual de machos a hembras en la cabrilla arenera, que a pesar de que ya han pasado 4 décadas de estudio con esta especie (Sadovy y Domeier, 2005). Aún se desconocen aspectos de la respuesta de la especie, principalmente en cautiverio. La afirmación de que no se han reportado casos de reversión de machos a hembras de la especie, es quizás una explicación a la ausencia de la feminización paradójica, a pesar de que, aparentemente en todos los tratamientos aplicados hubo una sobredosis en el suministró la hormona. Podría darse una explicación de la existencia de algún mecanismo inhibitor del proceso, a nivel genético.

8.7. Crecimiento de la cabrilla arenera post-tratamiento

La teoría inicial y parte de la justificación de este estudio es lograr un mayor crecimiento en individuos monosexos, en este caso se escogió la masculinización mediante el uso de la 17 MT. La idea fue evitar el gasto energético derivado de la reproducción, produciéndose individuos de un solo sexo. Además, como algo complementario, se pretendía que la 17 MT propiciara un crecimiento mayor en peces tratados con esta hormona, que en peces no tratados, como en el caso de *Cyprinus carpio* L. (Lone y Matty, 1980), donde obtienen incremento en longitud y peso, aún después de finalizado el tratamiento de 90 días (dosis de 1-10 mg/kg).

Si bien se esperaba lograr un crecimiento significativo en los peces masculinizados con la 17 MT, según los resultados obtenidos, no fue así. Nuevamente, la razón por la que no se logro un mayor crecimiento individual, es consecuencia de que los tratamientos fueron excesivos. Lone y Matty (1980) lograron mejorar el crecimiento en *C. carpio* L. usaron 17 MT, sin embargo, reportan que los mejores resultados de crecimiento en tratamientos con las dosis menores (1 mg/kg). La máxima dosis utilizada por estos autores fue de 10 mg/kg y encuentran un crecimiento menor.

Una de las razones por las que no se detectó un mayor crecimiento en los peces tratados puede ser que; en todos los casos no hubo presencia de hembras, de alguna manera la producción de monosexos se llevó a cabo en todos los tratamientos, incluyendo los controles. Así, la reproducción se inhibió en todos los tanques, por tal motivo no hubo un gasto energético que pudiera marcar alguna diferencia entre alguno de los tanques o tratamientos.

Con respecto a la posible injerencia de la 17 MT como un factor de crecimiento, una posible explicación al resultado puede atribuirse al desorden hormonal producido por el suministro de esta hormona. Se concluye que como consecuencia del desorden hormonal producido, en lugar de ser un factor favorecedor del crecimiento, fue un inhibidor del crecimiento somático.

Regresando nuevamente a la posible filtración de la hormona como factor de crecimiento en los tanques de los peces control, podría indicar el efecto a todos los especímenes por igual, de ahí que no se hayan presentado diferencias significativas, tanto en el peso como en la longitud. Esto como ya se ha comentado, no es posible probarlo, aunque no se descarta. Con relación a esta contaminación, por actividad biológica (Contreras *et al.*, 2005), se sabe, que aunque la 17 MT es indetectable por medio de técnicas como la del HPLC; la masculinización se da, por efecto de los residuos producidos por la descomposición de la 17 MT, como metabolitos polares no identificados, (Curtis *et al.*, 1991).

En cuanto a la heterogeneidad de tallas y pesos, el resultado no fue el esperado, evidentemente, un inconveniente para llevar a cabo esta especie a cultivo a una mayor escala. A este respecto, se podrían argumentar en términos de la eficiencia al alimentarse, y esto mismo tiene relación a la facilidad de moverse en la columna de agua para atrapar el alimento. Particularmente, esta especie se caracteriza por ser voraz, y si este comportamiento no se observa, puede deberse a problemas durante su desarrollo. Esto último, tampoco se ha reportado en trabajos anteriores y se explica en relación a la presencia, o ausencia de la vejiga gaseosa.

Durante la parte inicial del periodo larvario hasta que finaliza, puede ser crítico la carencia o llenado deficiente de la vejiga gaseosa en el subsecuente desarrollo. La vejiga gaseosa, entre otras cosas, le da equilibrio y orientación al pez, además le facilita desplazarse verticalmente en la columna de agua (Zilberg *et al.*, 2004). En los peces utilizados en este estudio, se pudo apreciar un comportamiento un tanto diferente al momento de la alimentación con respecto a otros trabajos (García-Gómez, 2003). La mayoría de los peces en observación prefieren alimentarse en el fondo y no en la columna de agua, este comportamiento se hizo evidente al finalizar el periodo larval. No se manifestaron mayores problemas y finalmente fue un comportamiento rutinario, aunque en un principio se atribuyó al estrés, no se le dió mayor atención. Al finalizar el experimento y sacrificar la totalidad de los peces, se realizaron disecciones separándose la gónada y el hígado; en este examen sorpresivamente se detectaron algunos peces sin vejiga gaseosa. Esta situación podría ser “normal”, si se acepta que de manera natural, hay algunas deficiencias o desarrollos “anormales”, Los peces en esa condición finalmente perecen, dado que son presas relativamente fáciles para otros predadores. En cautiverio, esta situación no se presenta, debido a que (a excepción del canibalismo) no tienen predadores y se favorece la supervivencia de estos peces con anomalías. Como ya se menciona, no existen reportes de este tipo de malformaciones, por lo tanto este documento, sienta el precedente para estudios futuros al respecto.

Invariablemente la razón por la cual se haya presentado una heterogeneidad de tallas, afecto de igual manera en todos los tratamientos. Incluso, la ausencia de vejiga gaseosa se presento indistintamente en todos.

Al principio de la discusión, se menciona el caso de larvas de tonalidad “oscura”, probablemente debida a algún tipo de estrés, por los cambios sufridos en la etapa de transición de larva a juvenil, los cuales resultan tan drásticos que incluso algunos murieron en esta etapa. Puesto que la tonalidad oscura empezó a presentarse al día 27 y terminó el día 32 DE, cronológicamente coincide con la flexión del notocordio y la terminación de la cuenta de elementos pares y escamas (Peña-Martínez *et al.*, 2004)). Justamente, también coincidió con la

coalimentación, suministrada del día 25 al 29 DE; además, coincidió con la resiembra para iniciar los experimentos el día 30 DE.

Como se detectó, una serie de eventos ligados a cambios morfológicos que pudieron haber afectado el desarrollo de algunas estructuras como, la ausencia de la vejiga gaseosa. Aunque, la falta del desarrollo de esta estructura también se puede deber a problemas de deficiencia en la nutrición (Yúfera y Darias, 2007).

El problema afectó de manera similar a la totalidad de los peces, en todos los tanques. La presencia y ausencia de la vejiga gaseosa afectó de igual forma a todos; luego entonces, los tratamientos posteriores no fueron responsables del desarrollo de esta estructura, ya que además para el día 3-4 DE, el proceso que conlleva la formación e inflado de la vejiga gaseosa debió haber finalizado.

8.8. Cuantificación de ARNm codificante para aromatasa en la cabrilla arenera.

Según los resultados obtenidos de la expresión de la aromatasa, en este trabajo son concordantes entre sí. La actividad de esta enzima definitivamente comprueba la presencia de hembras en los experimento; y se sabe, que la expresión de la aromatasa varía según la especie y estado fisiológico del pez (edad, peso, desarrollo de la gónada, sexo)(Sudhakumari *et al.*, 2005), por lo cual resulta difícil la comparación con otras especies ícticas. De acuerdo con los resultados en los geles, fue débil la intensidad de la señal indicadora de la presencia de la aromatasa, tanto en los días de muestreo, como entre los diferentes tratamientos. En general, después de haber encontrado un 100 % de masculinización en los peces control y un deficiente desarrollo gonadal en los peces tratados, además de la ausencia de gónadas femeninas, explica la señal débil de la aromatasa, si esta no fue mayor, realmente no hubo desarrollo de gónadas femeninas. Esto puede ser un indicador del desarrollo de hembras genotípicas, dando paso al desarrollo de machos fenotípicos debido a la acción del esteroide.

El nivel alto de expresión de la aromatasa (el mayor registrado) en los ejemplares tratados con 30 MT, para el día 39 DE, sugiere que el resultado podría atribuirse a la presencia de algún pez que estuviere diferenciando sexualmente como hembra. El registro de este nivel correspondería a alguna gónada de hembra. La expresión débil de la aromatasa, puede ser un reflejo de algún tipo de inhibición de esta enzima, lo cual, según lo reportado por Kitano *et al.* (1999), esta supresión o inhibición puede dar como resultado la diferenciación de machos fenotípicos

Con los resultados obtenidos en cuanto al tiempo y dosis necesarias para la masculinización (de los cuales se discute que la dosis debe ser menor a la mínima utilizada en el presente experimento), se prevé la necesidad de realizar otros ensayos dirigidos a esclarecer las interrogantes derivadas de esta investigación. Por ejemplo, para el caso de detectar la actividad de la aromatasa se hace necesario reducir el intervalo de tiempo entre la toma de muestras, posiblemente sea necesario recolectar muestras diarias o al menos cada dos días a partir del inicio con los tratamientos con el esteroide.

Los tratamientos hormonales tuvieron otra acción esperada y satisfactoria tomando en cuenta que impidieron la reproducción y esta es: los tratamientos con 17 MT produjeron entre el 40 y 50 % de ausencia de gónadas y el restante fue de gónadas con desarrollo anormal, obteniendo en total un 100 % de esterilidad. Si se considera que el resultado fue similar para todos los tratamientos se concluye que “el tratamiento de 15 mg/Kg y el tiempo de 30 días de administración, son suficientes para lograr el 100 % de esterilidad en la cabrilla arenera”.

Como una consecuencia del escaso desarrollo gonadal de los peces provenientes de los tratamientos hormonales, si se considera el IGS, los controles mostraron un desarrollo gonadal superior al mostrado por los peces tratados con 17 MT.

También se concluye que después de realizar la detección de la hormona en el agua mediante el HPLC, no hubo evidencia suficiente para afirmar que la 17 MT, pudo haberse filtrado a los tanques control y con esto tener algún efecto en la masculinización de los peces del grupo control.

Con las condiciones de cultivo prevalecientes en el presente trabajo, se pudo diagnosticar un nuevo reporte de la precocidad de la cabrilla arenosa en cautiverio, detectándose machos con actividad espermática a los 60 DDE.

9. Conclusiones

- Después del análisis histológico realizado durante la diferenciación sexual en larvas y juveniles, cuyos tamaños oscilaron entre los 2 mm y los 74 mm., se concluye que el periodo lábil comprende el intervalo de los 13.2 a 43 mm de L.P., durante el cual se sugiere suministrar el esteroide.
- La administración a través del alimento inerte de la 17 MT, en dosis crecientes desde los 30 DDE, así como los tiempos de administración probados, provocaron la ausencia y malformación de las gónadas e inhibieron la diferenciación sexual de hembras y produjeron esterilidad. Puesto que, el resultado fue similar para todos los tratamientos, se concluye que la dosis de 15 mg/Kg, durante 30 días de administración, fue suficiente para lograr el 100 % de esterilidad en la “cabrilla arenera”.
- El IGS es un indicador útil del efecto de la 17 MT, administrada en exceso durante el desarrollo de la gónada.
- Bajo las condiciones de cultivo que prevalecieron durante el experimento, se detectaron machos con actividad espermática a los 60 DDE y 50 mm de L.P. en promedio, e inclusive un espécimen de 27.2 mm de L.P. (lo cual no ha sido reportado anteriormente para la especie), permite concluir que el esteroide utilizado fue capaz de acelerar la precocidad en el desarrollo de la gónada en esta especie.
- Las dosis y tiempos de suministro de la hormona no incrementaron el peso y la longitud de los individuos con respecto al grupo control.
- El esteroide 17 MT administrado a la cabrilla arenera, a través del alimento inerte, tuvo un efecto marcado sobre la expresión de la enzima aromatasa, disminuyendo rápidamente esta actividad, lo que indica que hubo una masculinización temprana de los individuos.

- La luz ultravioleta fue eficiente para eliminar la 17 MT, al punto de no ser detectada por análisis de HPLC. Sin embargo, considerando que hubo el 100 % de masculinización en los controles, es muy probable que haya habido presencia de metabolitos transformados a partir de la 17 MT, con el mismo efecto de masculinización.

19. Recomendaciones para trabajos futuros

El presente trabajo, ha evidenciado que aún faltan estudios relacionados con la determinación del sexo de la cabrilla arenosa y las variables que podrían influir. Algunas de estas variables son:

- Temperatura
- Fotoperíodo
- Densidad
- Salinidad
- pH

Incluso, a raíz de los resultados encontrados, determinados todos los tratamientos como excesivos, a futuro es conveniente probar tratamientos menores a los probados, tanto en tiempo como en dosis.

Considerando que los peces del grupo control se masculinizaron por inmersión, como consecuencia de la contaminación del agua por filtración de metabolitos producto de la transformación de la 17 MT, un planteamiento para trabajos futuros es que se hagan pruebas de masculinización por inmersión.

Para la detección de la 17 MT se recomienda para trabajos futuros, realizar análisis con un espectro mucho mayor de esteroides o metabolitos no polares, para detectar la presencia de algún producto resultante.

Es recomendable también, para trabajos futuros, mantener un grupo control externo, libre de cualquier posibilidad de contaminación con algún esteroide.

Ya que con el tratamiento de 15 mg/Kg y 30 días de administración de la hormona, se obtuvieron resultados similares que con los tratamientos con dosis y tiempos mayores, se recomienda realizar experimentos en los que el límite superior sean los mencionados al inicio de este párrafo.

Se considera factible iniciar la coalimentación de alimento vivo con alimento inerte a los 20 DDE y de este modo también iniciar el suministro de alimento inerte con la 17 MT al día 25 DDE.

Se recomienda utilizar una densidad mayor al inicio de los tratamientos hormonales, con el fin de poder obtener un mayor número de muestras para análisis histológico, con una periodicidad de al menos cada 3 días.

El sistema de larvicultivo SC-18, puede ser adecuado para realizar este tipo de experimentos, pero por un tiempo no mayor a 60 DDE, después de este tiempo se recomienda utilizar un sistema de cultivo con tanques con mayor volumen.

Al realizar disecciones en los peces muestreados, es conveniente observar con detenimiento la posible ausencia o malformaciones de estructuras, tales como la gónada y la vejiga gaseosa.

Se recomienda también la realización de métodos donde se manipulen variables ambientales para lograr la masculinización. Se sugiere utilizar como variables ambientales la temperatura y el fotoperiodo. Se puede tomar como referencia una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 14:10 (luz:oscuridad). Las variaciones pueden ser hacia arriba y hacia debajo de las mencionadas.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abucay, J.S. & G.C. Mair,. 1997. Hormonal sex reversal of tilapias: implications of hormone treatment application in closed water systems. *Aquaculture Research*, 28: 841-845.
- Al-ablani S.A & R.P. Phelps. 1997. Sex reversal in black crappie *Pomoxis nigromaculatus*: effect of oral administration of 17 α -methyltestosterone on two age classes. *Aquaculture*, 158:155-165.
- Allen, L.G., T.E.Hovey, M.S.Love & J.T.W. Smith. 1995. The life history of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) within the southern California bight. *CalCOFI Rep.* 36: 1–11.
- Alvarez-González, C. A., 1999. Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 108 pp.
- Alvarez-González, C. A. 2003. Ontogenia enzimática y nutrición larvaria de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis Doctoral. CICIMAR-IPN, México. 164 pp.
- Alvarez-González, C. A., J. L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, S. F. Martínez-Díaz, D. E . Hernández-Ceballos, T. Grayeb-Del Alamo, M. Moreno-Legorreta,. & R. Peña-Martínez. 2001. Effect of stocking density on the growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *J. World Aquaculture Soc.*, 32: 130-137.
- Alvarez-Gonzales 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis de Doctorado. CICIMAR-IPN, México. 164 p.
- Beardmore, J. A., G. C. Mair & R. I. Lewis. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, 197: 283-301.

- Baroiller, J.F. & D'Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part C, 130: 399-409.
- Baroillier, J.-F., Y. Guigen & A. Fostier. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 910– 931.
- Basavaraju, Y.I, G. C. Mair, H. M. M. Kumar, S. P. Kumar, G. Y. Keshavappa & D. J. Penman. 2002. An evaluation of triploidy as a potential solution to the problem of precocious sexual maturation in common carp, *Cyprinus carpio*, in Karnataka, India. *Aquaculture*, 204: 407-418.
- Blázquez M.; Felip A.; Zanuy S.; Carrillo M. & Piferrer, F. 2001. Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *Journal of Fish Biology*, 58: 342-358.
- Blázquez M., F. Piferrer, S. Zanuy, M. Carrillo & E. M. Donaldson. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture*, 135: 329-342.
- Cadena-Roa, M.A. & G. Roldan Libenson. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de cabrilla. SEPESCA-UABCS. México. 55 pp.
- Civera-Cerecedo, R., J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, H. Nolasco-Soria, C. A. Alvarez-González, B. Anguas-Vélez, R. Peña-Martínez, M. Rosales-Velázquez, V. Carrasco-Chávez, R. García-Gómez & E. Goytortúa. 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. pp. 352-406. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Rique Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés, N. Simoes, VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 3 al 6 de septiembre. Nuevo León, México.
- Contreras-Sánchez W. M., Marquez-Couturier G., Feist, G.W., Giannico, G.R., Schreck C.B. 2005. Elimination of methyltestosterone from intensive masculinization systems: use of ultraviolet irradiation of water. *In*: R. Harris,

- I. Courter, and H. Eгна (Editors), Twenty-Second Annual Technical Report. Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 185-194. pp
- Chatain B., E. Saillant & S., Peruzzi. 1999. Production of male populations of European seabass, *Dicentrarchus labrax* L. by use of the synthetic androgen 17 α -methyldehydrotestosterone. *Aquaculture*, 178: 225-234.
- Curtis, L. R., F.T. Diren, M.D. Hurley, W. K. & R.A. Tubb. 1991. Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 99: 193-201.
- De Martini, E. E. 1987. Test of ovariety subsampling options and preliminary estimates of batch fecundity for two *Paralabrax* species. *Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.* 28: 168-170.
- Desprez D., E. Géraz, C.Mélard, P. Bosc & J. F. Baroiller. 2003. Production of a high male offspring with a natural androgen, 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OHA4), in Florida red tilapia. *Aquaculture*, 216: 55-65.
- Devlin R.H. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Dziewulska K. & J. Domagała. 2004. Testicular development in the sea trout (*Salmo trutta* morpha *trutta* L.) after sex differentiation, with a reference to precocious maturation. *J. Appl. Ichthyol.*, 20, 282–289.
- Ericsson, D.L., J.E. Hightower & G.D. Grossman. 1985. The relative gonadal index: an alternative index for quantification of reproductive condition. *Comp. Biochem. Physiol.* 81: 117-120.
- Feist G., C-G. Yeoh, M.S. Fitzpatrick & C.B. Schreck. 1995. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*, 131: 145-152.

- Gale, W.L., M.S. Fitzpatrick, M. Lucero, W.M. Contreras-Sánchez & C.B. Schreck. 1999. Production of all-male populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. *Aquaculture*. 178,349-357.
- García-Gómez, R.E. 2003. Estudios en el crecimiento y supervivencia de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en dos tiempos de destete con dietas microparticuladas. Tesis de Licenciatura. UABCS. México. 63 p.
- González-Cabeza, A. 2003. Actividad citocromo P450 aromatasa en la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona. 226 p.
- Goto R., T. Kayaba, Sh. Adachi & K. Yamauchi. 2000. Effects of temperatura on sex determination in marbled sole *Limanda yokohamae*. *Fisheries Science*. 66: 400-402.
- Grayeb-Del Alamo, T. 2001. Efecto de la densidad en el crecimiento de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) cultivada en jaulas flotantes. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 119 p.
- Hastings, P. A. 1989. Protogynous hermaphroditism in *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae). *Copeia*, 1989 (1): 184-188.
- Hofsten, J. V. & P-E. Olsson, 2005. Zebrafish sex determination and differentiation: involment of FTZ-F1 genes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3: 63
- Holloway, A.C. & J.F. Leatherland. 1998. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in teleost fishes with emphasis on the involvement of gonadal sex steroids. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8: 409-429.
- Hovey, T. E. & L. G. Allen. 2000. Reproductive patterns of six populations of the spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, from southern and Baja California. *Copeia* 2000:459–468.
- Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company, U.S.A. 661 p.

- Jameson Jr. E.W., 1988. Vertebrate reproduction. A Willey-Interscience publication. U.S.A., 526 p.
- Johnstone, R., D.J. Macintosh, & R.S. Wright. 1983. Elimination of orally administered 17 α -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) and *Salmo gairdneri* (Rainbow trout) juveniles. *Aquaculture*, 35: 249-257.
- Kidd, M. & E. Hallerman 2003. Evaluación de una línea de tilapia seleccionada vs. Una masculinizada genéticamente en sistemas de recirculación para acuicultura. *Panorama Acuícola Magazine*, 8 (2): 12-14.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. & Abe, S.-I., 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.* 23, 167–176.
- Kroon, F.J., P.L. Munday, D.A. Westcott, J.P. A. Hobbs & N.R. Liley. 2005. Aromatase pathway mediates sex change in each direction. *Proc. R. Soc. B*, 272: 1399-1405.
- Lluch-Cota, D. B. 1995. Aspectos reproductivos de la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae) en Bahía Magdalena-Almejas, Baja California Sur, México. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S. 116 pp.
- Liu. M. & Sadovy, Y. 2004. The influence of social factors on adult sex change and juvenile sexual differentiation in a diandric, protogynous epinepheline, *Cephalopholis boenak* (Pisces, Serranidae). *Journal of Zoology*, 264: 239-248.
- Lone K. P. & Matty A. J. 1983. The effect of ethylestrenol on the growth, food conversion and tissue chemistry of the carp, *Cyprinus carpio* *Aquaculture*, 32: 39-55.

- Mair G. C., J. S. Abucay, D.O.F. Skibinski, T.A. Abella & J.A. Beardmore. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all male tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 396-404.
- Martínez-Brown, J.M. 2007. Efecto del nivel de ácidos grasos esenciales y proteína en el alimento de reproductores de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) sobre la calidad de las primeras fases de vida. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 99 pp
- Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, R. Martinez-Pecero & J.L. Ortiz-Galindo, 1990. Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base a su biología temprana, 67-74 pp. In: G. de la Lanza-Espino y Arredondo Figueroa, J.L. (eds.). La Acuacultura en México: de los conceptos a la producción. Instituto de Biol. UNAM. México.
- Matzuda, M. 2003. Sex determination in fish: lesson from the sex-determining gene of the teleost medaka, *Oryzias latipes*. *Develop. Growth Differ*, 45, 397-403.
- Miller, J. D. & R. N. Lea, 1972. Guide to the coastal marine fishes of California. Calif. Dep. Fish and Game, E. U. A. Fish Bull. (157), 249 pp.
- Moyle, P.B., y J.J. Cech, Jr. 1996. Fishes: An Introduction to Ichthyology. Prentice-Hall.
- Moyle, P.B. & J.J.Cech. 1988. FISHES: An Introduction to Ichthyology, 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Ocampo-Cervantes, J. A. 2002. Desarrollo gonádico y actividad reproductiva de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) en la Bahía de La Paz, Baja California Sur. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 78 pp.
- Oda, D. L., R. J. Lavenberg, & J. M. Rounds. 1993. Reproductive biology of three California species of *Paralabrax* (Pisces: Serranidae). Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep. 34:122–131.

- Oldfield, R.G. 2005. Genetic, abiotic and social influences on sex differentiation in cichlid fishes and the evolution of sequential hermaphroditism. *Fish and Fisheries*, 6, 93-110.
- Ortiz-Galindo J. L. J. L. Castro-Aguirre, J. R. Torres-Villegas, S. Dumas, T. Grayeb del Alamo, M. O. Rosales-Velázquez & C. A. Alvarez-Gonzales. 2000. Reproduction, embryonic development, and preflexion larvae of the yellowfin mojarra (*Gerres cinereus*)(Walbaum, 1792)(Percoidei: Gerreidae) in the Bahía de La Paz. 80^a Reunión Anual de la American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Del 14 al 20 de junio del 2000. La Paz, B. C. S. México.
- Pandian, T.J. & S.G. Sheela. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1 –22.
- Peña-Martínez, R., S. Dumas, M. Villarejo-Fuerte & J.L. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, 219: 633-644.
- Piferrer, F. & E.M. Donaldson. 1994. Uptake and clearance of exogenous estradiol-17 β and testosterone during the early development of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), including eggs, alevins and fry. *Fish Physiol. Biochem.*, 13 (3): 219-232.
- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* **197**: 229-281.
- Pitcher, T.J. 1996. Environmental biology of fishes. Chapman & Hall. p.p. 412
- Popma, T. J. & B. W. Green. 1990. Sex reversal of tilapia in earthen ponds. Research and Development Series No. 35. International Center for Aquacultural and Aquatic Environments, Auburn University, Alabama, 15 pp.
- Ramos, J., L. Rodríguez, S. Zanuy & M. Carrillo. 2002. Influencia del fotoperiodo sobre la aparición de la primera madurez sexual, comportamiento

- reproductivo y calidad de puestas en hembras de lubina *Dicentrarchus labras* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanog.* 18 (1-4): 175-182.
- Rodríguez-Gutiérrez, M., 1992. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. AGT. México. 79 pp
- Rosales-Velázquez, M. O., R. E. Martínez-Pecero, B. Anguas-Vélez, M. Contreras-Olguín, & E. O. Rodríguez-Morales. 1992. Inducción al desove de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (STEINDACHNER)(PISCES: SERRANIDAE) mantenida en laboratorio. III Congreso Nacional de Ictiología. 24-27 de noviembre. Oaxtepec, Mor. México.
- Rosales-Velázquez, M. O. 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae)mantenida en cautiverio. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 62 pp.
- Rougeot, C., B. Jacobs, P. Kestemont & C. Melard. 2002. Sex control and sex determinism study in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders. *Aquaculture*, 211: 81-89.
- Sadovy Y., Domeier M.L. 2005. Perplexing problems of sexual patterns in the fish genus *Paralabrax* (Serranidae, Serraninae). *J.Zool., Lond.*, 267: 121-133.
- Sadovy, Y. & Shapiro, D.Y., 1987. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia* 1987, 136– 156.
- Sanchez-Gallegos, J. 2007. Organogénesis del sistema reproductor de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) desde larva hasta juvenil. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 63 pp.
- Sathyanarayana Rao, H.N. & H.N. Sathyanarayana Rao. 1983. Hormonal manipulation of sex in the common carp, *Cyprinus Carpio* Var. *communis* (Linnaeus). *Aquaculture*, 35: 83-88.

- Schreck C.B., Giannico, G.R., Feist, G.W., Contreras-Sanchez, W.C., Pascual-Valencia, L.E., Hernández-Vidal, U., & Campos-Campos, B. 2004. Elimination of methyltestosterone from intensive masculinization systems: use of ultraviolet irradiation of water *In*: J. Burreight, C. Flemming, and H. Eгна (Editors), Twenty-Second Annual Technical Report. Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, pp. 185-194.
- Simpson E.R., C.C. Rubin, G. Boon, W.C. Robertson, K. Britt, C. Speed & M. Jones. 2002. Aromatase- a brief overview. *Ann. Rev. Physiol.* 64: 93-127.
- Smith, C.L. 1965. The patterns of sexuality and the classification of serranid fishes. *Am. Mus. Novit.*, pp. 1–20.
- Smith, C.L. & P.H. Young. 1966. Gonad structure and the reproductive cycle of the kelp bass, *Paralabrax clathratus* (Girard), with comments on the relationships of the serranid genus *Paralabrax*. *Calif. Fish Game* 52: 283–292.
- Solar, I.I. E.M. Donaldson, & G.A. Hunter. 1984. Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17 α -methyltestosterone. *Aquaculture*, 42, 129-139.
- Steffens, W., 1989. Principles of fish nutrition. Ellis Horwood Limited, Chichester. 384 pp.
- Strickland, J.D.H. & T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada*.
- Vera-Cruz E.M. & G.C. Mair. 1994. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 122: 237-248.
- Wang, L-H & Ch-L. Tsai. 2006. Photoperiod influences the ontogenetic expression of aromatase and estrogen receptor α in developing tilapia brain. *General Comparative Endocrinology.*, 145: 62-66.

- Welzien, F.A. E.Anderson, Ø. Andersen, K. Shalchian-Tabrizi & B. Norberg. 2004. The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 137 (part A): 447-477.
- .Weatherley A. H. & H. S. Gill, 1987. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *Journal of Fish Biology*. 33 : 851 – 859.
- Wootton R.J. 1989: Introduction: Strategies and tactics in fish reproduction. In: Potts G.W. & Wootton R.J. (eds), Fish reproduction: Strategies and tactics. *Academic Press, London*: 1–12.
- Yamamoto E., 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, 173: 235-246.
- Yúfera M. & M.J. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268: 53-63.
- Zhou, L. & J.F. Gui, 2008. Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers. *Fish Physiol. Biochem.* (in press).
- Zanuy S., F. Prat, M. Carrillo & N.R. Bromage. 1995. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living. Resour.* 8: 147-152.
- Zilberg D., R. Ofir, T. Rabinski & A. Diamant. 2004. Morphological and genetic characterization of swinblader non-inflation in angelfish *Pterophylum scalare* (Cichlidae). *Aquaculture*, 230: 13-27.