



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



INDUCCIÓN A LA INVERSIÓN SEXUAL DE LA
CABRILLA ARENERA *Paralabrax*
***maculatofasciatus* MEDIANTE LA**
ADMINISTRACIÓN ORAL DE LA HORMONA
17 α -METILTESTOSTERONA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

SANDRA LUZ ENCISO LIZÁRRAGA

LA PAZ, B.C.S., NOVIEMBRE DE 2008.

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL****SECRETARÍA 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 05 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:

"INDUCCIÓN A LA INVERSIÓN SEXUAL DE LA CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*

MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE LA HORMONA 17 α -METILTESTOSTERONA"

Presentada por el alumno:

ENCISO

Apellido paterno

LIZÁRRAGA

materno

SANDRA LUZ

nombre(s)

Con registro:

A	0	5	0	1	1	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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 REVISORADirector de tesis
PRIMER VOCALMC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO

PRESIDENTE

DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO

SECRETARIO

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

SEGUNDO VOCAL

DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ

2°. DIRECTOR

TERCER VOCAL

MC. MARCIAL TRINIDAD VILLALEJO FUERTE

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE

IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 6 del mes Noviembre del año 2008, el (la) que suscribe SANDRA LUZ ENCISO LIZÁRRAGA alumno(a) del

Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A050118 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

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

MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO y DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ y cede los derechos del trabajo titulado:

"INDUCCIÓN A LA INVERSIÓN SEXUAL DE LA CABRILLA ARENERA *Palabrax maculatofasciatus*

MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE LA HORMONA 17 α -METILTESTOSTERONA"

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: sandraprettiest@hotmail.com jortiz@ipn.mx rochoa@ipn.mx

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


B.M. SANDRA LUZ ENCISO LIZÁRRAGA

nombre y firma

A Santiago y Victoria
A Sergio y Estrella
Con todo mi amor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas CICIMAR-IPN, por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo, tanto por el uso de instalaciones como de materiales.

A mi director de tesis el M. en C. José Luis Ortiz Galindo, por el apoyo, el tiempo dedicado, las atinadas observaciones y sugerencias que fueron clave para la culminación de este trabajo.

Un especial agradecimiento a mi codirectora la Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez, por toda la ayuda que siempre me brindó en el laboratorio, por la confianza que tuvo en mí durante la realización práctica de este trabajo. Por enseñarme que la histología es una herramienta muy valiosa pero a la vez apasionante.

Al Comité Revisor, Dr. Iván Murillo A., por su interés en este trabajo, el apoyo y asesorías que amablemente nos dio para los análisis cromatográficos. Al M. en C. Marcial Villalejo Fuerte y al Dr. José de la Cruz Agüero por sus sugerencias y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al M. en C. Martín Oscar Rosales Velázquez por dejarme formar parte de su incansable lucha por masculinizar a la cabrilla. Gracias Martín por todo el apoyo y por siempre estar ahí para solucionar las broncas y enseñarme a ser optimista y que al final todo esto, resultaría en algo bueno.

Al Dr. Sergio Martínez, por sus asesorías estadísticas y el manejo de los datos, por su tiempo y por su paciencia Muchas Gracias.

Gracias al Laboratorio de Morfofisiología, por el uso de instalaciones, equipo, reactivos etc, para el procesamiento de muestras y análisis histológico.

Gracias al Laboratorio de Química Orgánica, que nos permitió hacer uso de las instalaciones, equipo y cristalería durante los análisis de calidad de agua y en los análisis cromatográficos.

Al Laboratorio de Histología de la UABCS campus Pichilingue por el apoyo en el uso de sus equipos para la digitalización de imágenes.

A mi familia por su cariño incondicional y estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para darle vuelta a la hoja y cerrar este libro, MIL GRACIAS.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Índice	I
Lista de Tablas	IV
Lista de Figuras	V
Glosario	VIII
Resumen	XIII
Abstract	XIV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
3. Justificación	14
4. Hipótesis	15
5. Objetivos	15
5.1 Objetivo General	15
5.2 Objetivos Particulares	15
6. Material y Métodos	16
6.1 Incorporación de la 17MT en el alimento inerte	16
6.2 Desarrollo experimental	17
6.3 Procesamiento de muestras histológicas	19
6.4 Caracterización de estadios de desarrollo en testículo para juveniles masculinizados	22
6.5 Análisis de residualidad de la 17MT en el agua del sistema de crianza	22
6.6 Análisis y digitalización de imágenes	24
6.7 Análisis estadístico	25

7. Resultados	26
7.1 Relación Peso-Longitud en juveniles experimentales durante los 90 días de tratamiento hormonal	26
7.2 Efecto de la 17MT sobre el crecimiento de los juveniles experimentales durante los 90 días de tratamiento	27
7.3 Comparación del peso de los tres meses de tratamiento en perspectiva a los diez meses de edad	30
7.4 Análisis histológico y proporción sexual	31
7.5 Análisis de la 17 MT residual en el agua del sistema de crianza de juveniles de la cabrilla arenera	43
8. Discusión	45
8.1 Exploración histológica inicial	45
8.2 Determinación de la edad inicial de aplicación, duración del tratamiento hormonal y dosis	46
8.3 Producción de individuos machos en el grupo control	47
8.4 Efecto de la 17 α -metiltestosterona sobre el crecimiento, masculinización y esterilización en juveniles de cabrilla arenera con 90 días de tratamiento	50
8.5 Reducción en el tamaño de la gónada e inhibición de su desarrollo	53
8.6 Ventajas de la esterilización	54
8.7 Análisis de residualidad de la 17MT mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. HPLC	55
9. Conclusiones	57
10. Recomendaciones	58
11. Literatura Citada	60

ANEXO A	66
ANEXO B	67
ANEXO C	68
ANEXO D	69
ANEXO E	70
ANEXO F	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutritiva de las dietas comerciales de la línea INVE diet.	17
Tabla 2. Diseño experimental del tratamiento con la 17MT para la inversión sexual.	18
Tabla 3. Etapas del procesador de tejidos con los tiempos de exposición correspondientes según el tamaño de la pieza para una adecuada deshidratación e impregnación en parafina.	20
Tabla 4. Características morfológicas del testículo de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> durante su maduración, tomada de Ocampo-Cervantes (2002).	22
Tabla 5. Peso promedio (g) obtenido durante los tratamientos hormonales	30
Tabla 6. Proporción sexual obtenida en juveniles de la cabrilla arenera durante los tres meses de tratamiento con la 17MT (en cada caso n=15).	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sección transversal de embrión de vertebrados. Posición de crestas germinales. Tomado de Balinsky (1978).	6
Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis en una gónada masculina. Las líneas continuas muestran las acciones de tipo estimulador o retroalimentación positiva, mientras que las líneas punteadas muestran las acciones de tipo inhibidor o retroalimentación negativa.	8
Figura 3. Estructura química de la testosterona y de la 17 α -metiltestosterona	9
Figura 4. Incorporación de la hormona 17MT en alimento inerte por el método de aspersión en una campana de extracción.	16
Figura 5. (A) Peso tomado en gramos para cada individuo en una balanza analítica Adventure™ ONAUS. (B) Longitud patrón en centímetros obtenida con un vernier digital VWRkit .	19
Figura 6. (A) Cortes transversales para la obtención de la pieza. (B) Pieza correspondiente al 20 % de la longitud patrón.	20
Figura 7. Proceso histológico. A) Deshidratación y transparentación, B) Inclusión, C) obtención de cortes, D ₁ y D ₂) métodos de tinción.	21
Figura 8. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución utilizado para la detección de hormona en muestras de alimento y agua.	23
Figura 9. Relación peso-longitud de los juveniles recolectados para el seguimiento semanal de 39 a 109 DDE.	26
Figura 10. Relación peso-longitud del concentrado de los datos mensuales; juveniles recolectados cada mes por tres meses.	27
Figura 11. Comportamiento de los datos respecto al peso en los tres tratamientos.	28
Figura 12. Comportamiento de los datos por sexo o condición respecto al peso.	28
Figura 13. Comportamiento de los datos respecto a la longitud en los tres tratamientos.	29
Figura 14. Crecimiento de los juveniles de cabrilla arenera durante los tres meses de tratamiento.	30
Figura 15. Micrografías tomadas de un corte transversal de la parte media de un ejemplar de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> a los 30 DDE, 20x, 40x y 120x respectivamente. Células germinales primordiales (CGP), Tejido mesodérmico (TM), Riñones (Rñ), Paquetes	31

musculares (PM), Células cuboidales del riñón (CC) Técnica Azul Anciano. AB, corresponde a un juvenil de cabrilla de 30 DDE con una talla promedio de 1.15 cm de longitud patrón.

- Figura 16. Micrografía de un corte transversal de un individuo de cabrilla arenera en el primer mes correspondiente al tratamiento de 30 mg de la 17MT, 40x. Estadio de proliferación. Gónada pareada (GP), Primeras espermatogonias (EG), Tejido mesodérmico (TM), Riñón (Rñ), Conducto mesonéfrico (CM), Segmento proximal (SP), Segmento distal (SD). Técnica de H-E . 34
- Figura 17. Micrografía de un corte transversal de un individuo de cabrilla arenera en el primer mes correspondiente al grupo control, 10x con 1.2 de aumento. Estadio de proliferación. Gónada pareada (GP), Lumen testicular (LT), Tejido mesodérmico (TM), Riñón (Rñ), Paquetes musculares (PM).Técnica de H-E. 35
- Figura 18. Proporción de sexos de la cabrilla arenera al primer mes de tratamiento. 35
- Figura 19. Gónada masculina de un individuo de cabrilla arenera al segundo mes correspondiente al tratamiento de 60 mg de la 17MT, 20x y 40x respectivamente. Maduración temprana. Membrana basal (MB), Células epiteliales (CE), Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ) Célula de Leydig (CL), Túnica albugínea (TA), Trabéculas (T). Técnica de H-E. 36
- Figura 20. Proporción de sexos de la cabrilla arenera al segundo mes de tratamiento. 37
- Figura 21. Gónada masculina de un individuo de cabrilla arenera al tercer mes correspondiente al grupo control, 8x. Maduración temprana. Riñón (Rñ), Paquetes musculares (PM), gónada masculina (GM). Técnica de H-E. 38
- Figura 22. A). Muestra una gónada masculina menos desarrollada en tamaño al tercer mes correspondiente a 30 mg de la 17MT, 4x a 1.2 de aumento, Maduración temprana. B). Muestra inhibición en el desarrollo de la gónada correspondiente al tercer mes en 60 mg de la 17MT, 4x a 1.5 de aumento. Riñón (Rñ), Criptas gástricas (CG). Técnica de H-E. 38
- Figura 23. Proporción de sexos de la cabrilla arenera al tercer mes de tratamiento. 39
- Figura 24. Gónada masculina de las muestras tomadas al tercer mes. Grupo control, 40x. Maduración media. Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Eritrocitos nucleados (E). Técnica de Feulgen. 40

- Figura 25. Gónada masculina de muestras al tercer mes. Tratamiento de 30 mg de la 17MT, 40x. Maduración temprana. Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Eritrocitos nucleados (E). Técnica Tricrómica de Mallory. 41
- Figura 26. Gónada masculina de muestras extraídas al tercer mes. Tratamiento de 30 mg de la 17MT, 40x y 120x respectivamente. Maduración media. Espermatocitos primarios (EC1), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Técnica de Feulgen. 42
- Figura 27. Se observa gónada masculina con actividad normal tercer mes. Tratamiento de 30 mg de la 17MT, con un acercamiento a 120x. Maduración media. Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Técnica Tricrómica de Mallory. 42
- Figura 28. Gónada masculina correspondiente al muestreo del tercer mes. Tratamiento de 60 mg de la 17MT, 120x. Maduración media. Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Técnica Tricrómica de Mallory. 43

GLOSARIO

Andrógeno: Hormonas sexuales masculinas provenientes de la testosterona, la androsterona y la androstendiona. Son hormonas esteroides cuya función principal es la de estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos (Hoar y Randall, 1969).

Células de leydig: Células localizadas en el tejido conjuntivo (estroma testicular) que se encuentra entre los distintos túbulos seminíferos. Estas células son secretoras de la testosterona (Estrada-Flores y Uribe-Aranzábal, 2002).

Células de sertoli: Células que se encuentran en el interior de los túbulos seminíferos envolviendo a las células germinales y dando lugar a la barrera hematotesticular. Estas células son estimuladas por la hormona foliculoestimulante (FSH) para generar la maduración de los espermios (Estrada-Flores y Uribe-Aranzábal, 2002).

Células germinales: Conjunto de células localizadas en las gónadas, que se convierten en gametos (óvulos y espermatozoides) a través de una división meiótica (Estrada-Flores y Uribe-Aranzábal, 2002).

Células somáticas: Células que forman el conjunto de tejidos y órganos de un ser vivo, procedentes de células madre originadas durante el desarrollo embrionario y que sufren un proceso de proliferación celular, diferenciación celular y apoptosis (Balinsky, 1978).

Cromatografía: Conjunto de técnicas basadas en el principio de adsorción selectiva cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla y en algunos casos identificar estos si es que no se conoce su composición (Snyder y Kirkland, 1979).

Cultivo: Procedimiento destinado a multiplicar organismos para su estudio o utilización (Reartes, 1995).

Cultivo monosexo: Producción de organismos de un solo sexo mediante la aplicación de técnicas de control sexual (Pandian y Sheela, 1995).

Desove continuo: En peces, es la capacidad de lograr puestas de huevos consecutivamente durante un periodo indefinido (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995).

Desove espontáneo: Puesta de huevos sin una manipulación previa de los organismos (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995).

Determinación sexual: Proceso a nivel cromosómico que determina la definición del sexo (Ruiz-Durá, 1988).

Diandría: Especies que tienen la capacidad de presentar individuos machos por dos vías: los que nacen machos y se mantienen así durante todo el ciclo de vida y los que resultan de una transformación sexual derivada de hembras (Thresher, 1984).

Diferenciación sexual: Proceso mediante el cual se genera el sexo de un individuo, es una expresión fenotípica que es el reflejo de la expresión genotípica (Ruiz-Durá, 1988).

Eclosión: Momento en el que un embrión se libera de la envoltura del huevo (Ruiz-Durá, 1988).

Eleuteroembrión: Fase del periodo embrionario que inicia desde el momento de la eclosión hasta la completa absorción del saco vitelino y el glóbulo de aceite (Balon, 2002).

Embrión: Segunda fase del periodo embrionario que inicia con el cierre del blastoporo y termina con la eclosión del huevo (Balon, 2002).

Epitelio: Tejido formado por una o varias capas de células que recubren todas las superficies libres del organismo, y constituyen el recubrimiento interno de las cavidades, órganos huecos, conductos del cuerpo, la piel y también forman las mucosas y las glándulas (Estrada-Flores y Uribe-Aranzábal, 2002).

Epitelio germinal: Epitelio peritoneal compuesto por células germinales primitivas. Al final del desarrollo embrionario es localizado en las gónadas conteniendo a las células sexuales (Ruiz-Durá, 1988).

Espermátide: Célula haploide derivada del espermatocito secundario. Su posterior transformación da lugar a los espermatozoides (Estrada-Flores y Uribe-Aranzábal, 2002).

Espermatocito: Célula derivada del proceso de la espermatogénesis, formada por división de una espermatogonia (Estrada-Flores y Uribe-Aranzábal, 2002).

Espermatogénesis: Proceso de proliferación de células germinales masculinas, cuyas etapas pasan sucesivamente por: espermatogonia, espermatocitos, espermátide y espermatozoide. Su proliferación causa crecimiento del testículo (Nagahama, 1983).

Espermatogonia: Primera generación de células germinales masculinas diploides, que se multiplica activamente por mitosis (Estrada-Flores y Uribe-Aranzábal, 2002).

Espermatozoide: Gameto masculino maduro. Es un elemento móvil, formado por una cabeza, el segmento intermedio y la cola. Forma parte del semen y sirve para la fecundación del óvulo. Contiene la mitad del número de cromosomas de la especie (Ruiz-Durá, 1988).

Esterilidad: Incapacidad reproductiva, ya sea temporal o definitiva en un organismo (Yamazaki, 1976).

Estrógeno: Hormonas sexuales de tipo femenino producidos por los ovarios. Los estrógenos actúan con diversos grupos celulares del organismo, especialmente con algunos relacionados con la actividad sexual, estimulando el desarrollo de las características sexuales secundarias (Hoar y Randall, 1969).

Feminización paradójica: Aromatización de un andrógeno a estrógeno, ocasionando la feminización de un organismo (Fenske y Segner, 2004).

Fenotipo: Expresión del genotipo en un determinado ambiente, es la manifestación visible del genotipo. Los rasgos fenotípicos incluyen rasgos físicos y conductuales (Villegas, 1995).

Fotoperiodo: Alternancia de horas de luz y de oscuridad durante un día (Begtashi *et al.*, 2004).

Gónadas: Órganos reproductores de los organismos que producen los gametos o células sexuales. En los vertebrados desempeñan una función hormonal, por lo cual también se les llama glándulas genitales (Balinsky, 1978).

Hermafroditismo: Condición que permite que individuos de una población funcionen con ambos sexos, de manera simultánea o secuencial en cualquier etapa de su vida (Shapiro, 1987).

Hermafroditismo protándrico: Modalidad de hermafroditismo donde el primer sexo formado es el femenino para posteriormente transformarse en machos funcionales (Sadovy y Shapiro 1987).

Hermafroditismo protogínico: Modalidad de hermafroditismo donde el primer sexo formado es el masculino para posteriormente transformarse en hembras funcionales (Sadovy y Shapiro 1987).

Hermafrodita secuencial: Modalidad en la que un organismo produce gametos femeninos en una temporada y en otra produce gametos masculinos (Sadovy y Shapiro 1987).

Hipófisis: Glándula compleja que se aloja en un espacio óseo llamado silla turca del hueso esfenoides, situada en la base del cráneo, en la fosa cerebral media, que

conecta con el hipotálamo a través del tallo hipofisario. La hipófisis es la glándula que controla al resto de glándulas del organismo (Ball y Baker, 1969).

Hipotálamo: Glándula que forma parte del diencefalo. Libera al menos nueve hormonas que actúan como inhibidoras o estimulantes en la secreción de otras hormonas en la hipófisis anterior (Ball y Baker, 1969).

Hormona: Sustancias segregadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endócrinas y también por células epiteliales e intersticiales con el fin de afectar la función de otras células (Hoar y Randall, 1969).

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica (Snyder *et al.*, 1988).

Inversión sexual: Proceso mediante el cual es posible dirigir el sexo de un organismo (Pandian y Sheela, 1995).

Juvenil: Periodo de desarrollo que se inicia a partir de que se cubre el cuerpo completamente de escamas hasta antes de la maduración de la gónada (Ortiz-Galindo, 1991).

Larva: Periodo que comprende tres fases: preflexión, flexión de la notocorda y posflexión. Durante este periodo se terminan de absorber las reservas endógenas, se flexiona la notocorda, se forma la placa hipúrica. Este periodo termina con la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares (Ortiz-Galindo, 1991).

Lumen: En los cortes histológicos se observa como el espacio vacío entre las estructuras que se presentan (Ocampo-Cervantes, 2002).

Macho primario: Macho que nace como tal y se mantiene en esa condición durante el resto del ciclo de vida (Lluch-Cota, 1995).

Maduración gonádica: Conjunto de procesos de crecimiento y desarrollo de las gónadas que posibilitan el inicio de la reproducción en los organismos (Ruiz-Durá, 1988).

Masculinización: Provocar la aparición de caracteres sexuales masculinos secundarios (Pandian y Sheela, 1995).

Oocito: Célula germinal femenina en proceso de convertirse en óvulo maduro (Ruiz-Durá, 1988).

Oogénesis: Formación, crecimiento y maduración de las células germinales femeninas en el ovario (Ruiz-Durá, 1988).

Ovario: Gónada femenina (órgano reproductor) productora y secretora de hormonas sexuales y óvulos (Ruiz-Durá, 1988).

Proporción sexual: Relación entre el número de hembras y machos en una población de organismos (Lluch-Cota, 1995).

Reversión sexual: Proceso mediante el cual se puede revertir el sexo original de un individuo que inicialmente sufrió una inversión sexual (Yamamoto, 1953).

Testículo: Gónada masculina, productora de los espermatozoides y de las hormonas sexuales (testosterona) (Ruiz-Durá, 1988).

Testosterona: Hormona androgénica producida por las gónadas masculinas. Para realizar su acción fisiológica o farmacológica se reduce en posición 5-alfa-dihidrotestosterona, que es la hormona activa (Hoar y Randall, 1969).

Vitelo: Reservas del oocito formados por lipoproteínas y fosfoproteínas derivadas de la vitelogenina para la nutrición del embrión (Ruiz-Durá, 1988).

Vitelogenina: Precursores del vitelo que son formados en el hígado en respuesta a la estimulación de los estrógenos (Ruiz-Durá, 1988).

RESUMEN

La cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868), es un pez común en las costas del noroeste de México. Actualmente, su cultivo se encuentra en desarrollo, sin embargo, presenta problemas de reproducción precoz. Es una especie hermafrodita protogínica y madura sexualmente a tallas pequeñas, lo que le ocasiona un retraso en su crecimiento debido al gasto energético. Para contrarrestar tales efectos y obtener individuos con una talla comercial en menor tiempo, se ha propuesto la producción de monosexos a partir de diversas técnicas, tales como el manejo de parámetros ambientales (temperatura y fotoperiodo), la hibridación, y el suministro de hormonas como medida más eficiente. Debido a la condición protogínica de la cabrilla, con la administración de hormonas androgénicas el sexo resultante sería el masculino. Este estudio se llevó a cabo con un lote de juveniles de cabrilla arenera (30 DDE) tratados con la hormona 17 α -metiltestosterona (17MT; Sigma No. M-7252) a través del alimento, con el fin de favorecer el desarrollo testicular. El lote de juveniles de cabrilla fue mantenido en un sistema cerrado de recirculación y alimentados a saciedad durante 90 días. Se probaron dos concentraciones del esteroide (30 y 60 mg/kg de alimento) más un testigo (alimento sin hormona) durante el tiempo de estudio. A los 30, 60 y 90 días de tratamiento fueron sacrificados 30 individuos por grupo para revisión histológica, paso clave para evaluar la eficiencia del proceso de masculinización. Se concluye que a los 30 días de tratamiento es el tiempo adecuado para administrar la 17MT. Se estimó que la dosis de la 17MT debe ser menor a la utilizada en este trabajo, ya que se presentaron casos de esterilidad hasta del 93 % de la población desde el primer tiempo de evaluación. La 17MT tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de los individuos tratados con respecto al grupo control ($P < 0.05$).

ABSTRACT

Spotted sand bass is an important food fish in the Northwest coast of México. Currently, its culture is in development; however, some problems with its weight gain have been reported. It is a protogynous hermaphrodite which reaches the sexual maturation at very small size, in consequence, its reproductive life begins at a very early stage and the energy is directed to gamete production instead of growth. The production of monosex populations is used to reduce the energy waste that implies the reproduction in aquaculture and to get organisms with acceptable growth to reach the commercial size in a short time. The processes to obtain monosex populations include: the control of environmental factors (like temperature and light), hybridization and hormone treatment which has proved to be the more effective way. The aim of this investigation was to evaluate the use of hormone to induce changes in the sex of juvenile of spotted sand bass. Due to their protogynous condition, the expected sex is male when treated with androgenic hormones. A juvenile batch of spotted sand bass was obtained in laboratory and the 17 α -methyltestosterone hormone (17MT; Sigma No. M-7252) was administered through the diet in order to promote the testicular development. Groups of juveniles (age, 30 d) were maintained in a recirculatory system and feeding "ad libitum" with or without hormone impregnated food during 90 days. The tested hormone concentrations were 30 and 60 mg/Kg of food. A control group without hormone treatment was simultaneously evaluated. Groups of 15 fish were randomly sampled at 30, 60, 90 days of hormonal treatment in order to make histological evaluation. With the obtained results, it was possible to determinate that 30 days is the optimal time to produce sexual modifications in spotted sand bass with 17MT. Apparently the optimal dosage to induce the masculinization in this species could be lower than 30 mg, because a 93 % of sterility (the total inhibition of gonad development) was recorded in the fish at first time of evaluation. At the tested concentrations, the 17MT had a negative effect on the growth compared with the control group ($P < 0.05$).

1. INTRODUCCIÓN

México cuenta con 11,592 kilómetros de costas y contribuye con el 1.4 % de la producción pesquera y acuícola mundial. Actualmente se coloca en el lugar 17, con un consumo per cápita anual de 12.8 kilogramos y con una demanda superior al 1.5 millones de toneladas de productos pesqueros (Anónimo, 2007). Sin embargo, la disponibilidad es de sólo un millón 16 mil toneladas, ya que el resto es destinado a la exportación, lo anterior de acuerdo con cifras de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (Anónimo, 2007). El valor de la producción pesquera nacional al cierre de 2007 fue de 13 mil millones 403 mil 265 pesos, cantidad que se mantiene constante desde 2003.

El sector acuícola muestra una tendencia hacia la ampliación de la oferta de alimento de origen marino previendo una reducción de la presión ejercida sobre las poblaciones naturales. Actualmente existen en el país más de 2,655 granjas acuícolas de engorda, con una superficie de 51,869 hectáreas y un volumen de 16.5 millones de metros cúbicos (Anónimo, 2007). En 2002 se produjeron alrededor de 187,485 toneladas por acuicultura, sin embargo, considerando que sólo se utiliza una pequeña porción (menos de 10%) de las áreas susceptibles para el desarrollo acuícola, se puede proyectar un nivel de producción de alrededor de 500,000 toneladas (Anónimo, 2004).

Entre las especies con valor comercial considerable que se cultivan tradicionalmente en México se encuentra principalmente el cultivo de camarón, el cultivo de algunos moluscos así como también el cultivo de peces. La piscicultura ha tenido avances importantes en nuestro país, sobre todo en el cultivo de peces dulceacuícolas, sin embargo, se espera en un futuro que la producción de peces marinos sea una actividad que genere al igual que en otros países, incrementos significativos tanto en su producción como en su valor (Tucker, 1998). No obstante, para el cultivo de peces marinos aun es necesario desarrollar paquetes

biotecnológicos que permitan un mejor aprovechamiento de los recursos en cada una de las regiones costeras de nuestro país.

En las costas de Baja California Sur, México, se encuentran un grupo de especies que por su importancia económica representan una oportunidad para la piscicultura, entre ellas representantes de la familia Serranidae, los cuales tienen gran demanda en los mercados locales cotizando en alto valor sus filetes de carne blanca y suave con aspecto agradable al consumidor.

Dentro de este grupo de especies destaca *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868), comúnmente conocida como cabrilla arenera, ya que es una especie que tiene características biológicas deseables para la producción acuícola, como la posibilidad de obtener desoves continuos, adaptación a cambios drásticos, fácil aceptación del alimento vivo, así como alimento inerte, además de que presenta una buena resistencia al manejo (Matus-Nivón *et al.*, 1990; Avilés-Quevedo *et al.*, 1995; Rosales-Velázquez, 1997).

El cultivo de esta especie tiene la desventaja de su madurez precoz, (Begtashi *et al.*, 2004). Esta característica afecta considerablemente al cultivo en términos de crecimiento, ya que al realizarse una inversión económica en alimento para la engorda de crías, con la finalidad de producir una biomasa suficiente en poco tiempo, el crecimiento se ve mermado por la desviación de energía hacia el desarrollo de la gónada (Beardmore *et al.*, 2001).

Para solucionar el problema de la reproducción precoz en peces se han realizado gran cantidad de trabajos experimentales donde se ha obtenido la inversión sexual o producción de monosexos a partir de técnicas tan diversas como: el manejo de los parámetros ambientales temperatura y fotoperiodo (Begtashi *et al.*, 2004), así como la hibridación y el suministro de hormonas esteroides, siendo ésta última, la técnica más efectiva (Beardmore *et al.*, 2001).

Los avances logrados con el uso de hormonas, han tenido un impacto importante en los procesos productivos de la piscicultura, gracias a la facilidad en el manejo de la reproducción. Un tratamiento hormonal puede traer incrementos en la producción, conociendo su fundamento fisiológico y metodológico. Es posible aplicar el tratamiento con las adecuaciones correspondientes a casi todas las especies de importancia económica para obtener el sexo deseado, que en algunas determina un mejor crecimiento o un fenotipo más atractivo al consumidor o bien, la posibilidad de retardar la maduración sexual, que afecta la conversión alimenticia y por ende los costos de producción. Asimismo, se puede inducir a una esterilidad en la especie, permitiendo el control de la reproducción, de esta manera, la energía gastada en la madurez sexual pueda invertirse en el crecimiento (Pandian y Sheela, 1995).

Las formas de diferenciación sexual hacen posible que en los peces el sexo sea manipulable por medio de hormonas, ya sea naturales o sintéticas (Yamamoto, 1969; Yamazaki, 1976). Los andrógenos o estrógenos son esteroides que actúan como un agente de inversión sexual dando como resultado el sexo masculino o femenino (Hunter y Donaldson, 1983; Gale *et al.*, 1999).

En relación a los aspectos reproductivos de *Paralabrax maculatofasciatus*, Rosales-Velázquez *et al.* (1999), reconocieron la evidencia directa de hermafroditismo protogínico en un ejemplar de la cabrilla arenera mantenido en condiciones de cautiverio, aunado a esto presentó una maduración sexual precoz (Álvarez-González, 2001). Debido a su naturaleza protogínica el fenotipo producido en un principio es el sexo femenino (seis meses de edad o a tallas alrededor de 100 mm). Para contrarrestar los efectos de la reproducción precoz en el cultivo de la cabrilla arenera y obtener organismos con una talla comercial mayor, se ha propuesto la inducción a la inversión sexual. La inversión sexual consiste en lograr la producción de organismos de un solo sexo por medio de la aplicación de esteroides a crías, las cuales aun no han definido el sexo. En este caso el cultivo de monosexos produciría machos, debido a su condición protogínica, lo cual sería beneficioso para el cultivo, ya que se ha observado que los machos presentan una talla mayor.

El propósito del estudio e investigación sobre el cultivo de la cabrilla arenera plantea la necesidad de tener conocimiento de todas las alternativas potenciales para el mejoramiento de su producción. De esta manera la posibilidad de producir un cultivo monosexo de la cabrilla arenera, sin duda sería un avance beneficioso para favorecer la optimización de su cultivo a gran escala.

2. ANTECEDENTES

El presente trabajo fue realizado en condiciones controladas tratando de resolver problemáticas en el contexto reproductivo, por tal motivo, cualquier estudio relacionado con aspectos de la reproducción, en particular aquellos que le competen a la determinación y diferenciación del sexo así como del conjunto de hormonas que intervienen, debe tomar en consideración los inicios del proceso reproductivo.

Las gónadas de los vertebrados, están compuestas por células somáticas de origen mesodérmico y de células germinales primordiales (CGP, futuras células sexuales) de origen autónomo extragonadal. Las gónadas presentan dos etapas: la indiferenciada y la diferenciación sexual (Ruiz-Durá, 1988). En los vertebrados, las crestas germinales se originan del borde superior de la capa visceral del mesodermo, en la mitad posterior del cuerpo, y se forma una banda longitudinal engrosada de epitelio mesodérmico. Las CGP surgen primero en otras estructuras del embrión y migran posteriormente a las crestas. La migración se lleva a cabo desde la vesícula vitelina y alantoidea a través del endodermo del intestino posterior; pasan por el mesenterio del intestino y desde ahí llegan a las crestas urogenitales en su porción genital (Ruiz-Durá, 1988). La gónada indiferenciada posee una estructura superficial, corteza, y cordones formados por células compactadas en el interior llamado médula. Esta diferencia de tejidos es lo que precisamente le permite a especies hermafroditas la bipotencialidad de expresarse en un sexo u otro en los procesos de oogénesis y espermatogénesis; la evolución del sexo de las CGP dependerá de su localización en los territorios sexuales mencionados (Balinsky, 1978). En los vertebrados, las crestas germinales se observan en la posición que muestra la figura 1.

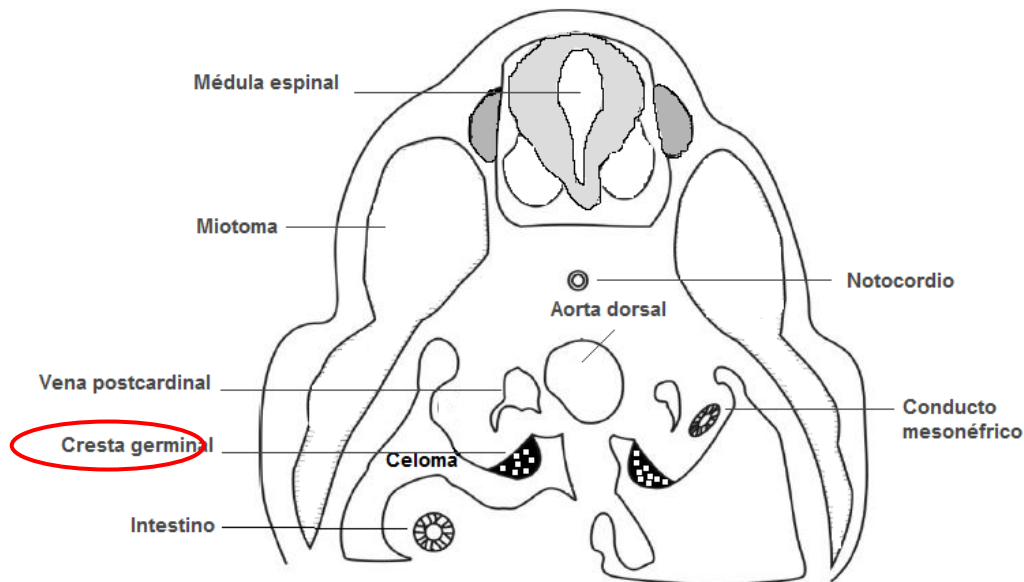


Figura 1. Sección transversal de embrión de vertebrados. Posición de crestas germinales. Tomado de Balinsky (1978).

Las hormonas relacionadas con la reproducción son sustancias químicas de naturaleza peptídica o esteroidea, y juegan un papel importante en los procesos de ovulación o liberación de espermatozoides, los cuales son fenómenos fisiológicos resultantes de la combinación de efectos centrales y periféricos. De los componentes centrales existen hormonas neurotransmisoras que controlan no solo el proceso de oogénesis o espermatogénesis sino también la producción de esteroides gonadales. La concentración tisular de hormonas esteroides es definitiva para los fenómenos biológicos locales, mientras que las concentraciones circulantes pueden variar al estímulo cíclico central (Lloyd, 1963).

El sistema neuroendócrino involucra un conjunto de hormonas del hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. El hipotálamo ejerce sobre la hipófisis un papel regulador, estimulador mediante la hormona liberadora de gonadotropina, Gn-RH e inhibido por la dopamina. La hipófisis produce gonadotropina, GTH, que es la hormona más relevante en la maduración de los oocitos, y está presente en las formas de GTH-I y GTH-II. La GTH actúa en el ovario sobre las células teca y granulosa sobre los folículos en la síntesis de 17β estradiol, ésta a su vez actúa sobre el hígado para

iniciar la síntesis hepática de vitelogenina para el oocito. En el caso de los testículos, la GTH actúa sobre las células de Leydig iniciándose la producción de 11-ceto-testosterona, hormona que estimula la maduración testicular vía espermatogénesis (Díaz y Neira, 2005).

Una de las hormonas más importantes en la reproducción y diferenciación sexual es la testosterona, la cual es un andrógeno propio del género masculino. La testosterona es un esteroide derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno, que tiene 19 átomos de carbono (C), un doble enlace entre el C4 y el C5, un átomo de oxígeno en el C3 y un radical hidroxilo (OH) en el C17, fórmula $C_{19}H_{28}O_2$. Esta estructura es necesaria para el mantenimiento de la actividad androgénica (Lloyd, 1963).

Las células de Leydig del tejido testicular son el principal lugar de síntesis de la testosterona a partir del colesterol. También se puede sintetizar en la zona rugosa de la corteza suprarrenal o en las células tecales del ovario. La gonadotropina hipofisaria LH, u hormona luteinizante, es la hormona reguladora específica de la producción de la testosterona (Ruiz-Durá, 1988). La función de la LH es actuar sobre las células de Leydig, estimulando la síntesis y secreción de testosterona, mientras que la acción de la hormona folículo estimulante (FSH) es actuar sobre las células de Sertoli, estimulando la síntesis de ABP (proteína ligante de andrógenos), la cual captura la testosterona impidiendo la salida en grandes cantidades desde los túbulos y prolonga su vida media. Parte de la testosterona va a los túbulos y el resto va al resto de los tejidos a cumplir sus otras funciones (Ruiz-Durá, 1988; Díaz y Neira, 2005).

Durante el desarrollo testicular, la testosterona puede tener un efecto estimulante o inhibidor sobre el eje hipotálamo-hipófisis, promoviendo o no la generación de factores de liberación de gonadotropinas (Figura 2).

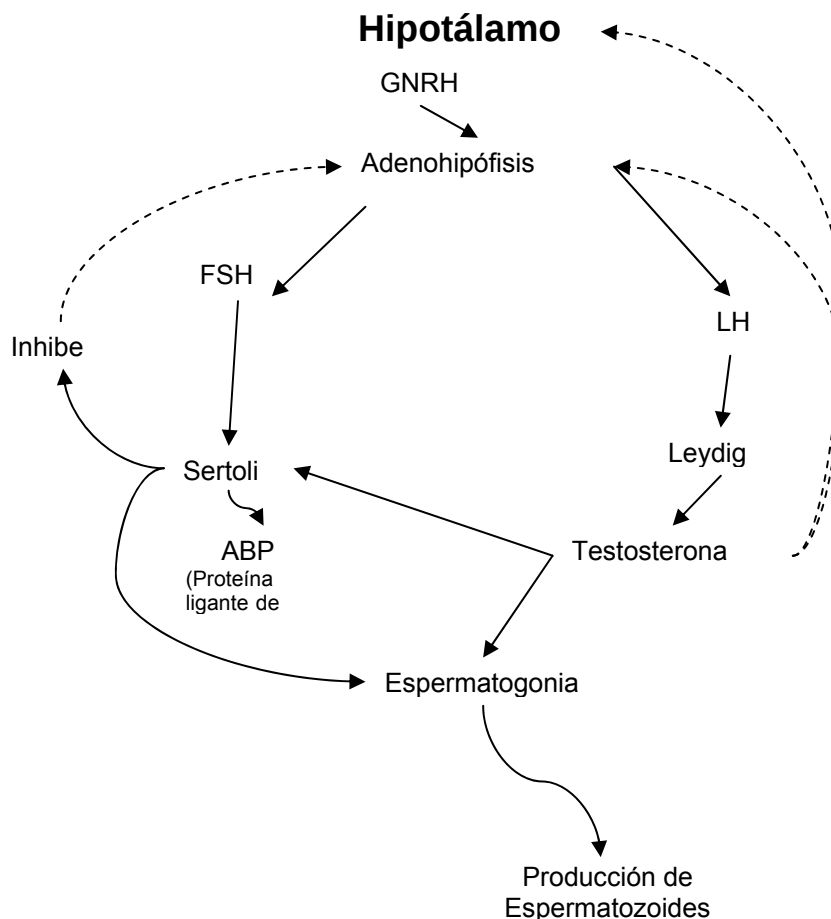


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis en una gónada masculina. Las líneas continuas muestran las acciones de tipo estimulador o retroalimentación positiva de la testosterona, mientras que las líneas punteadas muestran las acciones de tipo inhibidor o retroalimentación negativa.

Como se puede observar en la figura anterior, por retroalimentación negativa la testosterona inhibe en el hipotálamo la producción de los factores liberadores de gonadotropinas hacia el sistema portal hipotálamohipofisario. La testosterona también inhibe en consecuencia la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, ya que los factores de liberación (GnRH) estimulan finalmente la secreción de LH y FSH en la hipófisis anterior. En tratamientos prolongados con andrógenos se suprime la secreción de gonadotropinas, lo que puede traer consigo efectos de hipotrofia testicular y supresión de la espermatogénesis (Pandian y Sheela, 1995).

Si bien la testosterona que es el andrógeno natural, puede presentar agregado de grupos metilos en el C1, C7 y C17 generando así cambios en sus propiedades

(Figura 3). La 17 α -metiltestosterona es un derivado especial porque conserva su acción androgénica y se activa por vía oral. Estos derivados alquilados de la testosterona son metabolizados lentamente en el hígado, después de su absorción oral. La testosterona natural, en cambio, sufre una rápida degradación en su primer paso por el hígado. Por tal motivo la testosterona no se administra por vía oral, ya que es rápidamente metabolizada (Lloyd, 1963).

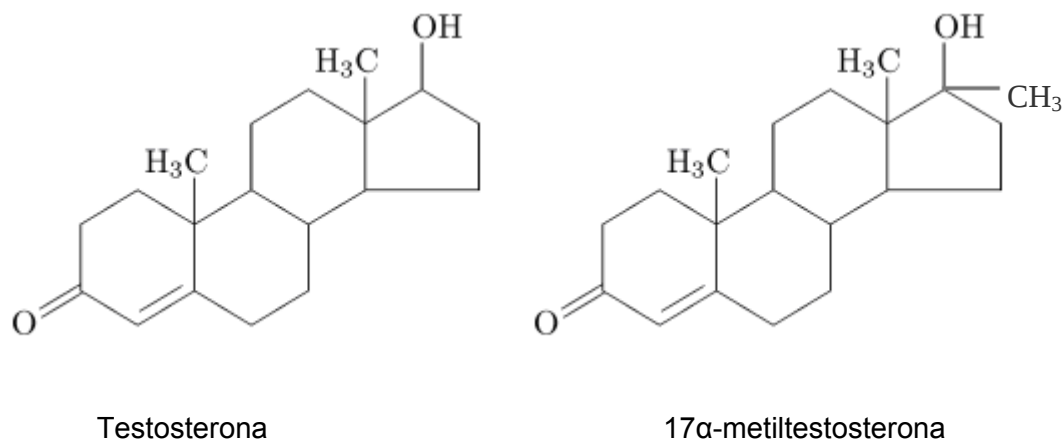


Figura 3. Estructura química de la testosterona y de la 17 α -metiltestosterona

Las hormonas esteroides entre ellas la testosterona natural, juegan un papel importante en el sistema endógeno, en el cual propician el desarrollo de la gónada y la diferenciación sexual (Lloyd, 1963).

Los trabajos relativos a la inversión sexual han sido desarrollados por varios investigadores. Los primeros estudios acerca de la manipulación sexual en peces fueron realizadas por Yamamoto (1953), quien utilizó alimento adicionado con cierta concentración de hormonas con efecto sobre la gónada y observó que, se puede obtener un tratamiento hormonal al mezclar homogéneamente el esteroide en la dieta. Generalmente el esteroide es aplicado al alimento por medio del método de aspersión en una solución etílica y la evaporación de la misma.

Simultáneamente con estos trabajos, se han realizado estudios para la detección de la hormona en el alimento mediante métodos cromatográficos. La

cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), es un método analítico de gran sensibilidad, que puede ser utilizado para la detección de compuestos químicos. El sistema está compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna separación y detector. La muestra se introduce en la corriente de la fase móvil y sus componentes se retardan debido a las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo en la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad única para la identificación de un compuesto. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil (McMaster, 1994).

Aunque los estudios iniciales sobre inversión sexual se enfocaron en un principio a los peces de ornato, posteriormente las investigaciones se fueron extendiendo para el beneficio del cultivo de otro grupo de especies de interés alimentario en su mayoría de agua dulce (Sathyanarayana-Rao y Satyanarayana-Rao, 1983).

Pandian y Sheela (1995) hicieron una revisión de los procedimientos empleados en los últimos años para la reversión sexual; particularmente mencionaron que las reversiones fueron posibles por el uso de 31 esteroides diferentes, en 47 especies de peces, pertenecientes a las familias Cichlidae, Cyprinodontidae, Anabantidae, Poeciliidae, Salmonidae y Cyprinidae.

Actualmente, alrededor de 11 andrógenos y 12 estrógenos sintéticos son utilizados para tratamientos de reversión sexual de diversas especies y solo cinco andrógenos y tres estrógenos naturales se han reportado para dichos tratamientos. Esto se debe al hecho de que las hormonas sintéticas son relativamente de menor costo y están sujetas a una eliminación más lenta en el organismo (Pandian y Sheela, 1995).

Una de las hormonas utilizadas para la masculinización es el andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona (17MT; Sigma No. M-7252), y ha sido probado sobre más de

25 especies, entre ellas se encuentran representante de las familias Salmonidae, Cyprinidae, Cichlidae y Percidae, que con el uso de la dosis adecuada resulta ser efectiva (Kohler, 1997; Chatain *et al.*, 1999).

Yamazaki (1983) probó una serie de hormonas esteroides incorporadas a la dieta, para la manipulación del sexo en peces entre ellas la 17MT sobre algunas especies del género *Tilapia* y el pez japonés *Carassius auratus*; se encontró que la concentración efectiva de la 17MT que se requiere para inducir a la masculinización está entre 20 y 30 mg/kg de alimento, mientras que en la trucha arcoiris *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*) la dosis fue entre 0.1 y 3 mg/kg de alimento.

Por otra parte, Chatain *et al.* (1999), estudiaron el efecto de la 17MT en la reversión sexual y desarrollo gonadal de *Dicentrarchus labrax*, El experimento inició a los 84 días después de la eclosión (DDE) con una combinación de tres concentraciones en el alimento (0.5, 3, 5 mg/kg) y se administró en tres tiempos (30, 60 y 90 días). Al término del experimento encontraron que el 100 % de los individuos presentaron una masculinización completa y permanente en todos los tratamientos, aunque se presentaron con algunas deformaciones testiculares (10 %). Al-ablani y Phelps (1997), analizaron el efecto de la 17MT sobre *Pomoxis nigromaculatus* a los 40 y 60 DDE con concentraciones de 0, 30 y 60 mg/kg de alimento durante 40 días, encontrando que a los 30 DDE, los tratamientos de 30 y 60 mg/kg de alimento de la 17MT dieron un porcentaje de masculinización de 71 y 90 % respectivamente.

Solar *et al.* (1984), estudiaron el efecto de la administración oral de la 17MT en la trucha arcoiris *Salmo gairdneri* (= *O. mykiss*) en concentraciones entre 1 y 100 mg/kg en el alimento por un periodo de 120 días, encontrándose que a bajas concentraciones de 17MT (1, 3 y 9 mg/kg) obtuvieron el 100 % de organismos machos, mientras que en concentraciones mayores (25, 50 y 100 mg/kg) entre el 79 y 90 % de los individuos tuvieron efectos de esterilidad. Mencionaron que se presentó un efecto de feminización paradójica en las concentraciones de 50 y 100 mg/kg. En el pez zebra *Danio rerio* se han llevado a cabo estudios de

masculinización con tratamiento de la 17MT donde se ha reportado que altas concentraciones y/o periodos de exposición prolongados a la 17MT favorece el desarrollo de ejemplares fenotípicamente hembras. A este fenómeno se le conoce como feminización paradójica (Fenske y Segner, 2004).

Se han realizado otros trabajos donde se han obtenido efectos de esterilidad e inhibición del desarrollo sexual, por ejemplo Sathyanarayana-Rao y Satyanarayana-Rao (1983) estudiaron el efecto de la manipulación hormonal con 220 mg/kg de la 17MT en el alimento de *Cyprinus carpio* un día después de la eclosión durante 131 días, al término del experimento obtuvieron un retardo significativo en el desarrollo de la gónada, que dio como consecuencia el 50% de esterilidad en los ejemplares machos. Según Yamazaki (1976) la administración oral de la 17MT durante cinco meses inhibe la diferenciación sexual en la trucha arcoiris.

Piferrer y Donaldson (1989), estudiaron la diferenciación de la gónada de *Oncorhynchus kisutch* con tratamientos de estrógenos y andrógenos durante diferentes estadios de su ontogénesis. De acuerdo con sus resultados, el periodo lábil para el tratamiento con estrógenos se encuentra localizado entre los 8 y los 13 DDE, y el periodo lábil para el tratamiento con andrógenos está localizado entre los 6 y los 13 DDE. La revisión histológica mostró la más alta sensibilidad a andrógenos a los 6 DDE, ya que observaron que la gónada se encontraba más desarrollada.

Los tratamientos de inversión sexual vía hormonal dependen de tres factores principales específicos para cada especie: dosis de hormona, edad inicial de aplicación y duración del tratamiento (Malison *et al.*, 1986; Pandian y Sheela, 1995). Las dosis pequeñas o grandes en combinación con duraciones cortas o largas del tratamiento, tienen un efecto significativo expresado en el éxito de la inversión del sexo. Normalmente, dosis elevadas o tratamientos prolongados traen consigo efectos de esterilidad o deformaciones en los gonoductos, mientras que las dosis pequeñas o tratamientos cortos podrían ocasionar una inversión incompleta. Según varios autores (Demska-Sakes y Sakes, 1997; Chatain *et al.*, 1999), la edad inicial de

aplicación es un factor importante, ya que para algunas especies es indispensable aplicarlo antes de que se inicie la diferenciación sexual para producir la inversión, mientras que en otras, una vez iniciada la diferenciación es posible dirigir el fenotipo del sexo con el tratamiento hormonal (Rougeot *et al.*, 2002).

Para que la manipulación hormonal tenga éxito, se debe tener ubicado el punto crítico en el cual ocurre la diferenciación del sexo e iniciar en ese momento el tratamiento hormonal (Chatain *et al.*, 1999). El punto crítico para la reversión sexual varía según la especie, por lo general se aplica en los períodos iniciales de vida, considerándose el tipo de desarrollo ontogenético que presenta cada especie. En particular, para la cabrilla arenera se ha reportado, Sánchez-Gallegos (2007), que a los 32 DDE, empiezan a aparecer las primeras células germinales primordiales propias del epitelio germinal y asimismo encontró que alrededor de los 95 DDE se presentó la diferenciación de la gónada a tejido ovárico. Por tal motivo, se considera que a los 30 días se tiene el punto crítico para los juveniles de la cabrilla arenera.

3. JUSTIFICACIÓN

Los cultivos monosexos traen grandes beneficios para la producción, ya que ofrece ventajas no solo en la tasa de crecimiento sino también en la eficiencia en el consumo de alimento, tallas uniformes y el control de la reproducción. Estas ventajas han sido observadas en cultivos de tilapia y salmones. Ha sido posible producir poblaciones monosexos mediante una manipulación sexual directa con hormonas, si el inicio del tratamiento ocurre en el punto crítico de desarrollo (Piferrer, 2001). Inicialmente la gónada está formada por un tejido bipotencial el cual tiene la capacidad de diferenciarse en ovario o testículo. Esta diferenciación está determinada genéticamente en la mayoría de los peces, no obstante dicha determinación puede ser modificada por la acción de esteroides aplicados vía oral.

Aunque existen otros métodos para la modificación del sexo en peces como el manejo de parámetros ambientales tales como temperatura y fotoperiodo, éstos requieren un monitoreo prolongado, ya que para asegurar el éxito del estudio, éstos suelen ser de larga duración, lo anterior, repercute en que se eleven los costos por mantenimiento e infraestructura. Por el contrario, el uso de esteroides tiene la ventaja sobre los otros métodos, que tienen menor costo, de fácil acceso y con un manejo adecuado se obtienen beneficios a corto plazo.

Lo anterior pone de manifiesto la importancia de considerar estas biotecnologías en los sistemas de producción en las instalaciones de este Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, con las adecuaciones pertinentes para las especies que aquí se manejan y las condiciones de trabajo, en las cuales de manera satisfactoria se podría incrementar los volúmenes de producción, tanto de las especies de ornato como de las especies que son para consumo humano, en este caso, la producción de la cabrilla arenosa se vería enormemente beneficiada, encaminada hacia su optimización total.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento con la hormona 17α -metiltestosterona administrada oralmente a juveniles de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* inducirá un proceso de masculinización en distinta proporción según la dosis utilizada y tendrá un efecto en el desarrollo de la gónada y en el crecimiento de los juveniles tratados que se expresará en el peso y la longitud con respecto a los juveniles del grupo control.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

5.1.1 Evaluar el efecto del esteroide 17α -metiltestosterona suministrada oralmente a una población de juveniles de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* en condiciones experimentales.

5.2 Objetivos Particulares

5.2.1 Seguir el crecimiento de los juveniles de la cabrilla arenera con base a la relación de peso y longitud patrón asociado al tratamiento con esteroide.

5.2.2 Determinar por histología la longitud patrón en la que se presentan las primeras células germinales de los juveniles tratados.

5.2.3 Determinar el tiempo de administración y diferentes dosis del esteroide 17α -metiltestosterona en juveniles de la cabrilla arenera.

5.2.4 Medir la proporción sexual en la población de los juveniles tratados con diferentes dosis de esteroide.

5.2.5 Comprobar la presencia o ausencia del esteroide en el sistema de crianza y en alimento por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Incorporación de la 17 MT al alimento inerte

Previo al inicio del desarrollo experimental, se realizaron los procedimientos para la obtención del alimento tratado con hormona. Primeramente, se preparó una solución estándar de la 17α -metiltestosterona (17MT) disolviendo una concentración de 500 mg de hormona en alcohol etílico al 70 %. A partir de la solución estándar se prepararon las concentraciones 30 y 60 mg de la 17MT: para la concentración de 30 mg se procedió a disolver 900 μ l de solución estándar en 50 ml de alcohol absoluto y para la concentración de 60 mg de la 17MT, se disolvieron 1800 μ l de solución estándar en 50 ml de alcohol absoluto.

Cada una de las concentraciones fue incorporada a un kilogramo de alimento comercial por el método de aspersion, lo cual se logró, rociando la solución sobre el alimento, mezclándola cuidadosamente durante unos minutos con la ayuda de una espátula (Popma y Grenn, 1990). Para el tratamiento control, el alimento fue rociado con 50 ml de alcohol absoluto libre de hormona (Figura 4). Las mezclas se dejaron reposar toda la noche en una campana de extracción para la evaporación del alcohol y al día siguiente el alimento fue almacenado en bolsas de plástico previamente etiquetadas de color negro para evitar la desnaturalización de la hormona, la cual es de naturaleza fotolábil.

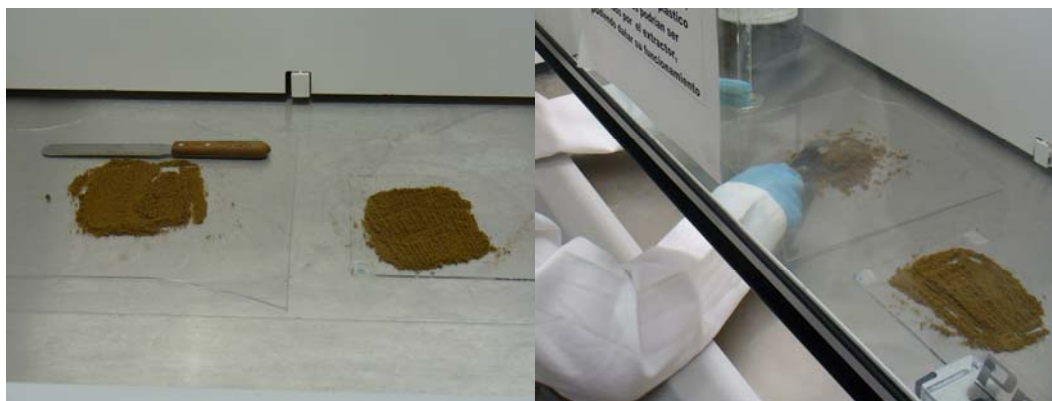


Figura 4. Incorporación de la hormona 17MT en alimento inerte por el método de aspersion en una campana de extracción.

El alimento comercial utilizado cubrió los requerimientos mínimos de contenido proteico determinados para esta especie por Álvarez-González *et al.* (2001) y fue de dos tipos: el primero fue Lansy CW, administrado durante el primer mes de tratamiento; el segundo fue Epac CW, el cual cumplió con el tamaño del alimento peletizado que los juveniles iban requiriendo; éste último fue administrado a partir del segundo mes hasta cumplir los 90 días del experimento, (véase en la sección de Desarrollo experimental). Ambos alimentos presentaron una textura adecuada para la incorporación de la hormona y pertenecen a la línea de productos de INVE diet (Tabla 1).

Tabla 1. Composición nutritiva de las dietas comerciales de la línea INVE diet. Valores proporcionados por la INVE Aquaculture.

Composición Nutritiva	Lansy CW	Epac CW
Humedad	7%	7%
Proteínas	58%	57%
Lípidos	15%	14%
Ceniza	12%	12%
Fibra	1%	1%
Fosforo	1.7%	1.2%
Vitamina A	30,000 UI//kg	30,000 UI/kg
Vitamina D3	2,500 UI//kg	2,500 UI//kg
Vitamina E	700 mg/kg	400 mg/kg
Vitamina C	2,000 mg/kg	1,500 mg/kg
Sum ω 3 HUFA	30 mg/g peso muerto	30 mg/g peso muerto
DHA/EPA	2	1.7

6.2 Desarrollo experimental

De un lote de juveniles de la cabrilla arenosa, producidos en la Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) se tomaron 630 juveniles con un peso promedio de 0.2 g y una longitud patrón promedio de 1.5 cm. Con este grupo de juveniles se dio inicio el desarrollo experimental y se comenzó con la manipulación vía oral de la 17MT sobre

estos juveniles experimentales. Los juveniles presentaban 30 DDE, tiempo que fue determinado como el punto crítico para la especie por Sánchez-Gallegos (2007).

Los juveniles fueron sometidos a dos concentraciones (30 y 60 mg/kg de alimento inerte) de la hormona 17 α -metiltestosterona (17MT) durante 90 días. Se tuvo al grupo control y a cada tratamiento por triplicado conforme al diseño experimental que se muestra en la tabla 2

Tabla 2. Diseño experimental del tratamiento con la 17MT para la inversión sexual.

Tratamientos	Tiempo de exposición	Réplicas
Control	30, 60 y 90 días	R1 R2 R3
30 mg/kg 17 MT	30, 60 y 90 días	R1 R2 R3
60 mg/kg 17 MT	30, 60 y 90 días	R1 R2 R3

Los juveniles fueron alimentados a saciedad durante cuatro veces al día, con un intervalo de tres horas en cada alimentación, después de cada alimentación diariamente se drenaron todas sus excreciones y el alimento no ingerido.

Durante los 90 días de tratamiento se realizó un seguimiento semanal sacrificándose un individuo por tratamiento y réplica, con el fin de realizar una revisión histológica de la gónada y tener evidencia de su desarrollo. En los días 30, 60 y 90 (primero, segundo y tercer mes respectivamente) de haber iniciado los tratamientos se sacrificaron de manera aleatoria 30 juveniles por tratamiento y réplica para realizar una evaluación del porcentaje de masculinización mediante proceso histológico. En todos los casos se tomaron previamente los valores de su peso (g) y longitud (LP) (Figura 5) para posteriormente evaluar su crecimiento. Cumplidos los 90 días cesó la alimentación con concentraciones de la 17MT.

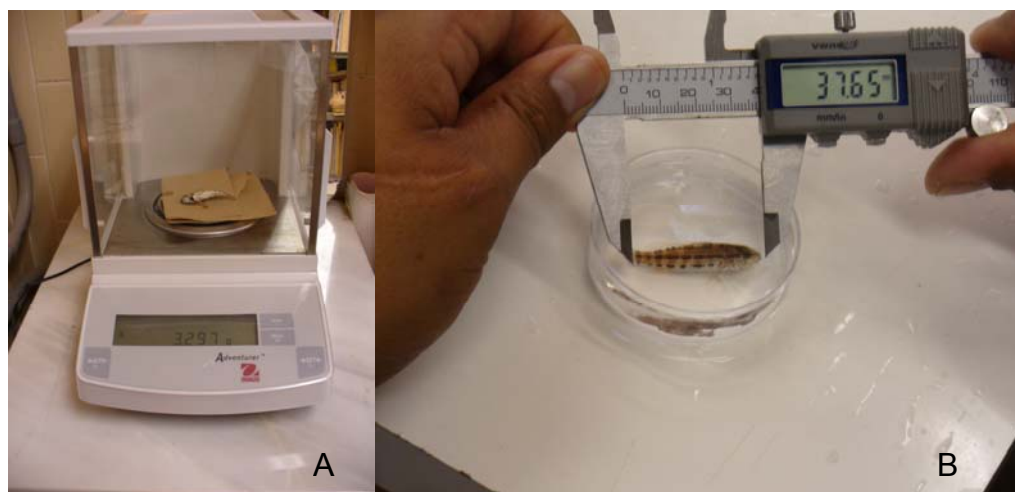


Figura 5. (A) Peso tomado en gramos para cada individuo en una balanza analítica Adventure™ ONAUS. (B) Longitud patrón en centímetros obtenida con un vernier digital VWRkit.

6.3 Procesamiento de muestras histológicas

Tanto los individuos tomados para el seguimiento semanal como para la evaluación mensual fueron sacrificados con una sobredosis del anestésico MSS-222 (Metilsulfonato de tricáína 222). Las muestras mensuales para evaluación de masculinización fueron enviadas al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR para su procesamiento y tinción con la técnica de Hematoxilina-Eosina, especificada más adelante. Las muestras para el seguimiento semanal fueron procesadas en el Laboratorio de Morfofisiología del CICIMAR-IPN. Durante el tiempo en que dio inicio el seguimiento semanal, las gónadas de los juveniles de cabrilla resultan difíciles de diferenciar morfológicamente a simple vista del resto del tracto, por lo que se hizo una disección transversal del pez por detrás de la aleta pectoral y otra en la parte anterior al ano, extrayéndose una pieza correspondiente aproximadamente al 20 % de la longitud patrón del organismo (Figura 6). Los especímenes en periodo juvenil presentaron una calcificación completa de sus estructuras óseas, lo cual dificulta el proceso histológico, por lo que se utilizó la solución de Davidson, fijador que por su contenido de ácido acético favorece la descalcificación. El tiempo de fijación se completó a las 48 hrs, y las piezas

previamente etiquetadas fueron lavadas en agua corriente e introducidas en alcohol al 70 %.

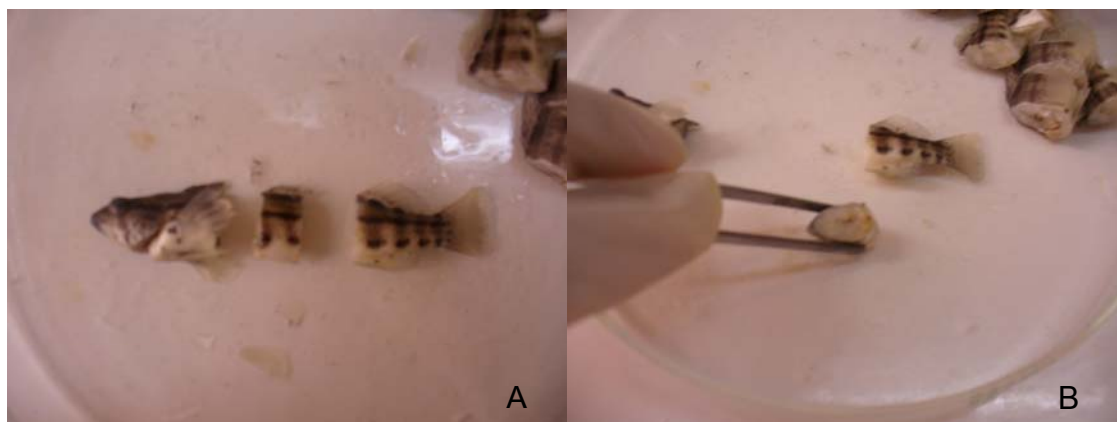


Figura 6. (A) Cortes transversales para la obtención de la pieza. (B) Pieza correspondiente al 20 % de la longitud patrón.

Las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación y transparentación en un procesador de tejidos automático (histokinette) (Tissue Tek II, modelo 4640-B) (Figura 7), este proceso consistió en hacer pasar los tejidos por un gradiente de alcoholes en orden ascendente, desde alcohol de 80 % hasta alcohol absoluto para la completa eliminación del agua. Después las muestras se expusieron en una sustancia miscible en parafina (cloroformo) para la eliminación del alcohol y luego el proceso terminó con impregnación en parafina (Tabla 3).

Tabla 3. Etapas del procesador de tejidos automático con los tiempos de exposición correspondientes según el tamaño de la pieza para una adecuada deshidratación e impregnación en parafina.

Etapas	Duración
Alcohol 80°	45 minutos
Alcohol 96° I	45 minutos
Alcohol 96° II	45 minutos
Alcohol 96° III	45 minutos
Alcohol Absoluto I	45 minutos
Alcohol Absoluto II	45 minutos
Alcohol Absoluto III	45 minutos
Alcohol – Cloroformo	30 minutos
Cloroformo	15 minutos
Parafina I	90 minutos
Parafina II	90 minutos
Parafina III	120 minutos

Posteriormente las piezas fueron incluidas en bloques de parafina para proceder a la obtención de cortes seriados de aproximadamente 3 μm , por medio de un microtomo (Micron^{HM} 355_s), y utilizándose cuchillas desechables. Los cortes fueron depositados en el baño de flotación con una mezcla de agua y gelatina (Bacto Gelatin, Disco Laboratories®) a una temperatura de 40°C que permite una adecuada expansión del corte y su adherencia al portaobjetos, la cual tuvo orientación de izquierda a derecha.

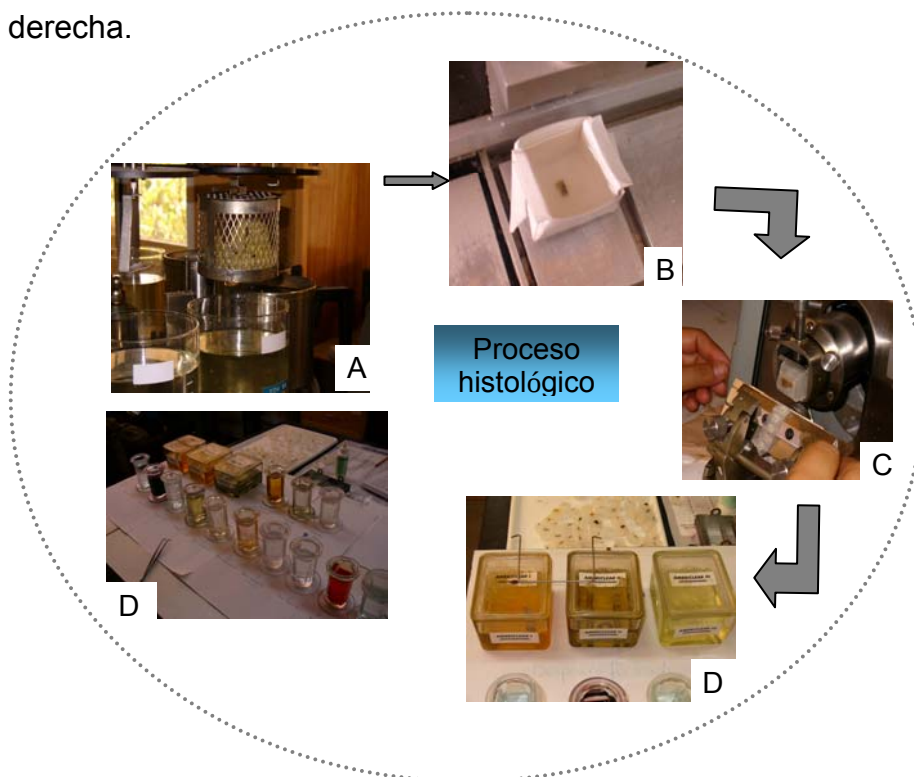


Figura 7. Proceso histológico. A) Deshidratación y transparentación, B) Inclusión, C) obtención de cortes, D₁ y D₂) métodos de tinción.

Se llevaron a cabo las tinciones de Hematoxilina-Eosina (Humason, 1962), Tricrómica de Mallory, Azul Alciano y Técnica de Feulgen (Gray, 1954). Las dos primeras son tinciones topográficas, que permitieron una observación general de las estructuras por efecto de contraste de los colorantes. La tercera y cuarta son tinciones histoquímicas; la tinción de Azul Alciano muestra mucopolisacáridos en color azul verde y núcleos oscuros propios de la zona pelúcida del tejido ovárico, mientras que la tinción de Feulgen permitió observar los núcleos propios de las células sexuales masculinas ya que hidroliza parcialmente el ADN y forma aldehídos libres, que al reaccionar con el reactivo de Schiff forman un precipitado magenta en

concentraciones proporcionales a la cantidad de ADN presente en los nucleolos (Gray, 1954). Las preparaciones fueron montadas de forma permanente con cytoseal (Stephensen Scientific).

6.4 Caracterización de estadios de desarrollo en testículo para juveniles masculinizados

La clasificación del estadio de desarrollo en el tejido testicular, se llevó a cabo con base a los criterios establecidos por Ocampo-Cervantes (2002) y que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características morfológicas del testículo de *Paralabrax maculatofasciatus* durante su maduración, tomada de Ocampo-Cervantes (2002).

Estadio	Índice espermático	Características Morfológicas
Proliferación	--	Espermatogonias y algunos espermatoцитos. Epitelio germinal continuo células del epitelio externo de la membrana basal con aspecto escamoso.
Maduración temprana	28 %	Presencia de espermatogonias, espermatoцитos, espermátides y espermatozoides. Células de la membrana basal, cúbicas en la parte media de las lamelas.
Maduración Media	57 %	Presencia de espermatogonias, espermatoцитos, espermátides y espermatozoides. Las primeras sólo en la periferia y en unión de lamelas. Epitelio germinal discontinuo sustituye al continuo el cual no llega a la túnica albúmina.
Maduración Avanzada	75 %	Epitelio germinal discontinuo ocupa la mayor parte de las lamelas, y el continuo se limita a la periferia de las lamelas. Cesa desarrollo de células germinales. Células epiteliales se tornan planas en la periferia de lamelas.
Reabsorción	--	Pocas espermatogonias sobre membrana basal y restos de espermatozoides en conductos espermáticos. Nuevamente células de membrana basal con aspecto escamoso, pero no tan altas como en la proliferación. Presencia de cuerpos amarillos.

6.5 Análisis de residualidad de la 17 MT en el agua del sistema de crianza

Debido a la importancia de los efectos producidos después de la exposición con la 17MT, es necesario determinar si después de 90 días de tratamiento existen residuos de la hormona en el agua del sistema de crianza. De esta manera, es necesario asegurar la calidad y la seguridad de los productos obtenidos a futuro mediante estos tratamientos. En términos de bioseguridad, se debe anular el impacto

de esta actividad sobre el medio ambiente, y prever cualquier efecto secundario sobre la sociedad consumidora.

Para ello, se propuso analizar el agua del sistema de crianza utilizando un método cromatográfico. Para determinar la concentración de la 17MT en los tanques de crianza, se tomaron muestras de agua por triplicado, de la cisterna y del sifón de uno de los tanques con tratamiento de 60 mg de la 17MT. Las muestras de agua fueron homogeneizadas vigorosamente por agitación. De cada una de las muestras se tomaron 10 ml que fueron tratados de la siguiente manera: Se pusieron al vacío a través de un cartucho de extracción en fase sólida (Alltech) empacado con sílica gel C18. Posteriormente el cartucho fue lavado con 3 ml de etanol destilado. El lavado etanólico se recolectó totalmente en un vial de borosilicato y se filtró a través de una membrana de nylon con diámetro de poro de 0.45 μm para eliminar partículas suspendidas. El filtrado fue concentrado a presión reducida hasta sequedad. Posteriormente, el residuo fue reconstituido con 200 μl de etanol. Una alícuota de 10 μl fue inyectada a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Perkin-Elmer series 200, equipado con una bomba cuaternaria, un sistema de inyección automática, columna de LC Oven 101, fijado a 25°C y como fase estacionaria una columna Supelcosil™ LC-18-DB (fase reversa C-18), de 25 cm $\times$ 4.6 mm, empacada con partículas de 5 μm . La detección fue realizada utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta a 242 nm. (Figura 8).



Figura 8. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución utilizado para la detección y cuantificación de la hormona en muestras de alimento y agua.

El nivel de sensibilidad del método fue determinado utilizando diluciones etanólicas de la 17MT a partir de una solución estándar a una concentración de 10 mg/ml empleando etanol como disolvente. Las diluciones preparadas fueron 1/10, 1/50, 1/100 y 1/1,000, la cuales fueron inyectadas al HPLC en alícuotas de 10 µl.

Se realizó un análisis de adiciones y recuperaciones de la 17MT en el alimento impregnado con hormona. Se elaboraron dos extractos de alimento y para su análisis, se pesó alrededor de 1 g de muestra (polvo seco) y se transfirió cuantitativamente a una columna de vidrio en donde fue extraída por percolación con 50 ml de metanol. El total del percolado fue recolectado en un vial previamente tarado y fue concentrado a sequedad a presión reducida a 40 ° C. Cada extracto fue disuelto en 1 ml de metanol y puesto en viales eppendorf para ser inyectados al cromatógrafo (10 µl). Se tomaron los tiempos de retención, el área bajo la curva, con la medición de la altura en los picos máximos de absorción.

6.6 Análisis y digitalización de imágenes

Se llevaron a cabo observaciones de las preparaciones histológicas obtenidas semanalmente mediante un microscopio óptico fotónico Zeiss con el que se pudo llevar un seguimiento de los tratamientos.

En el caso de las preparaciones de las muestras mensuales, éstas fueron analizadas al microscopio con los objetivos de 10x, 45x y 100x, identificando las estructuras de la gónada y realizando una valoración del porcentaje de masculinización de cada tratamiento. La digitalización y procesamiento de imágenes fue por medio de un microscopio óptico (Nikon) en objetivos de 4x, 10x, 20x y 60x con Optizoom en intervalos de 0.8x a 2.0x, con la ayuda de una cámara (Nikon) y del paquete Optiphot-2.

6.7 Análisis estadístico

Con el fin de evaluar la proporción de sexos se aplicó una prueba de Chi-cuadrada (χ^2) y comparar entre los dos grupos que recibían distinta concentración de 17MT en el tratamiento, con un nivel de significancia de ($P < 0.05$). Para la evaluación del efecto del tratamiento hormonal sobre el peso y la longitud de juveniles se aplicaron pruebas de normalidad, seguido por un análisis de varianza de una y dos vías y al encontrar diferencias significativas, se utilizó la prueba de Tukey para detectar a que tratamiento se debió la diferencia. También se realizó un análisis mensual con el método no paramétrico de Friedman utilizando la ecuación:

$$\chi_r^2 = \left[\frac{12}{ba(a+1)/12} \sum R_1^2 \right] - 3b(a+1).$$

El análisis se realizó utilizando el programa de Microsoft Office Excel y el paquete estadístico, STATISTICA Versión 6.1 de Statsoft.

7. RESULTADOS

7.1 Relación Peso-Longitud en juveniles experimentales durante los 90 días de tratamiento hormonal

Las mediciones realizadas de peso y longitud patrón, tanto para el seguimiento semanal como el muestreo mensual fueron utilizadas para hacer una relación entre ambas variables, lo cual permitió hacer una observación detallada del comportamiento de los datos de manera general a lo largo del trabajo experimental.

Los datos semanales corresponden a partir de los 39 DDE hasta los 109 DDE, tiempo durante el cual mostraron una tendencia de crecimiento exponencial, y pocos fueron los casos que se mostraron ligeramente fuera del patrón de crecimiento normal (Figura 9).

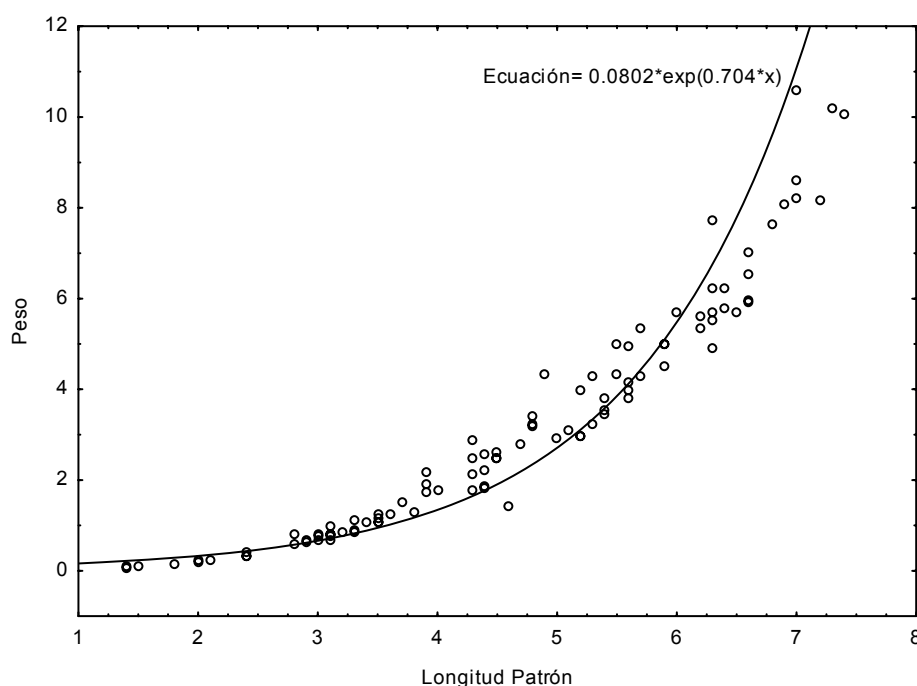


Figura 9. Relación peso-longitud de los juveniles muestreados para el seguimiento semanal de 39 a 109 DDE.

En la relación peso-longitud mensual, se hace mención a la categoría de los individuos muestreados (sexo o condición) durante los tres meses de tratamiento. La figura 10 muestra en la mayoría de los casos una misma tendencia de crecimiento, a

excepción de ciertos casos anómalos que se desvían considerablemente de la curva (individuos que su peso no corresponde en proporción a su longitud). Se observa que los datos anómalos corresponden en su mayoría a individuos machos y uno estéril.

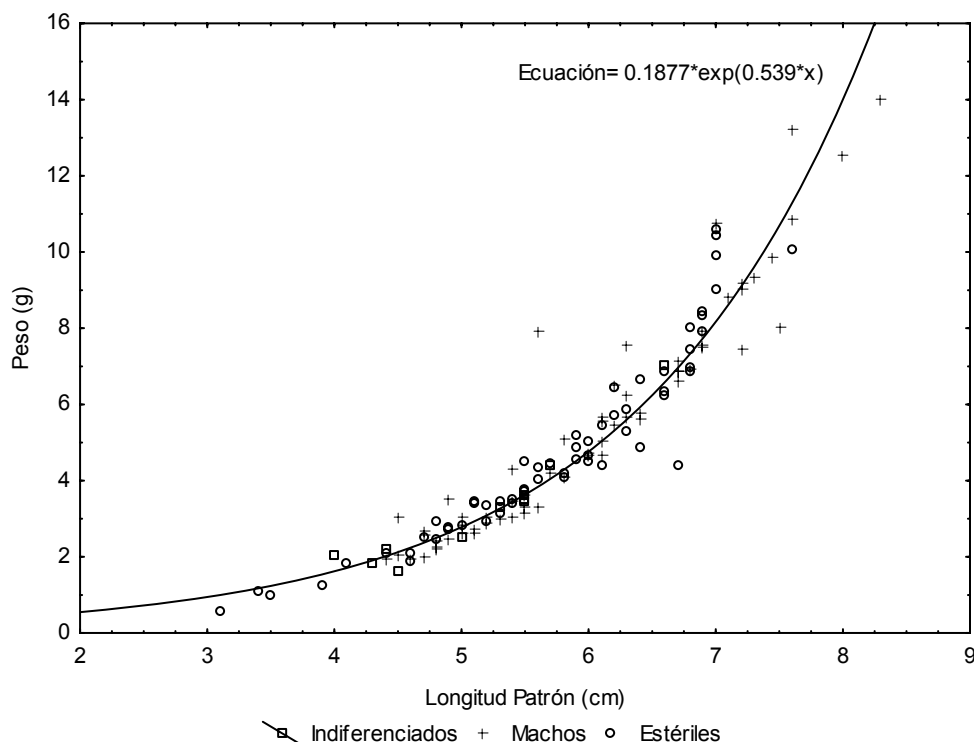


Figura 10. Relación peso-longitud del concentrado de los datos mensuales; juveniles recolectados cada mes por tres meses.

7.2 Efecto de la 17MT sobre el crecimiento de los juveniles experimentales durante los 90 días de tratamiento

Los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad, presentándose con un comportamiento normal $p > 0.2$ tanto para el peso como para la longitud patrón (ANEXO A).

Se realizó un análisis de variancia del concentrado de los datos mensuales de peso y longitud, y se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos (control, 30 y 60 mg de la 17MT) (Figura 11). Posteriormente, al aplicarse una prueba a posteriori, Tukey, se observa que las diferencias significativas $P < 0.05$ fueron debidas al grupo control (ANEXO B).

En el grupo control se observó una tendencia a presentar mayor peso, por lo que se favoreció el crecimiento de los individuos; Los individuos sometidos a tratamiento hormonal presentaron un crecimiento menor respecto al grupo control; se observó un aletargamiento en su desarrollo (Figura 11).

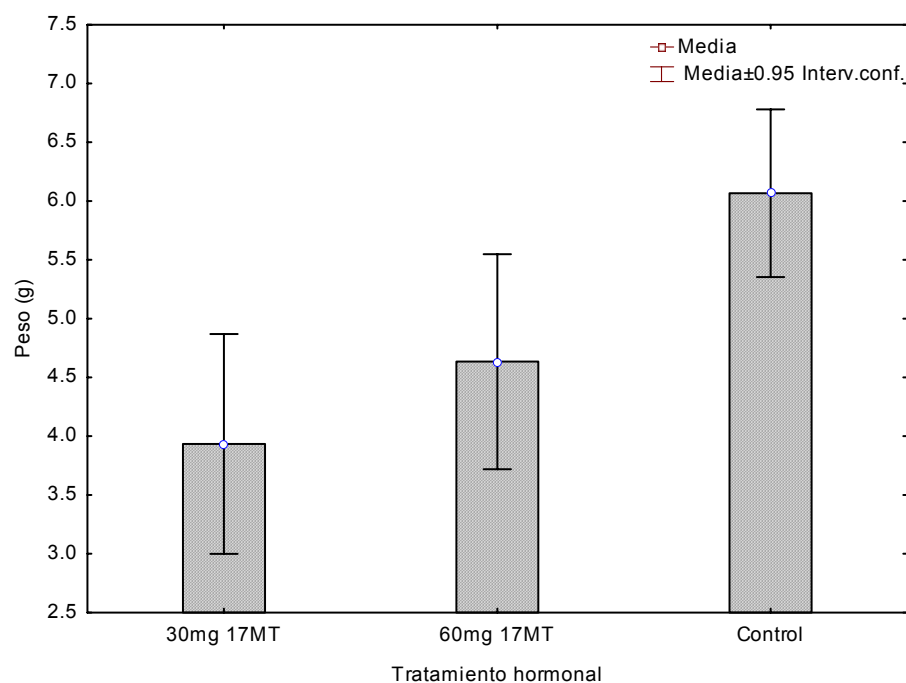


Figura 11. Comportamiento de los datos respecto al peso en los tres tratamientos.

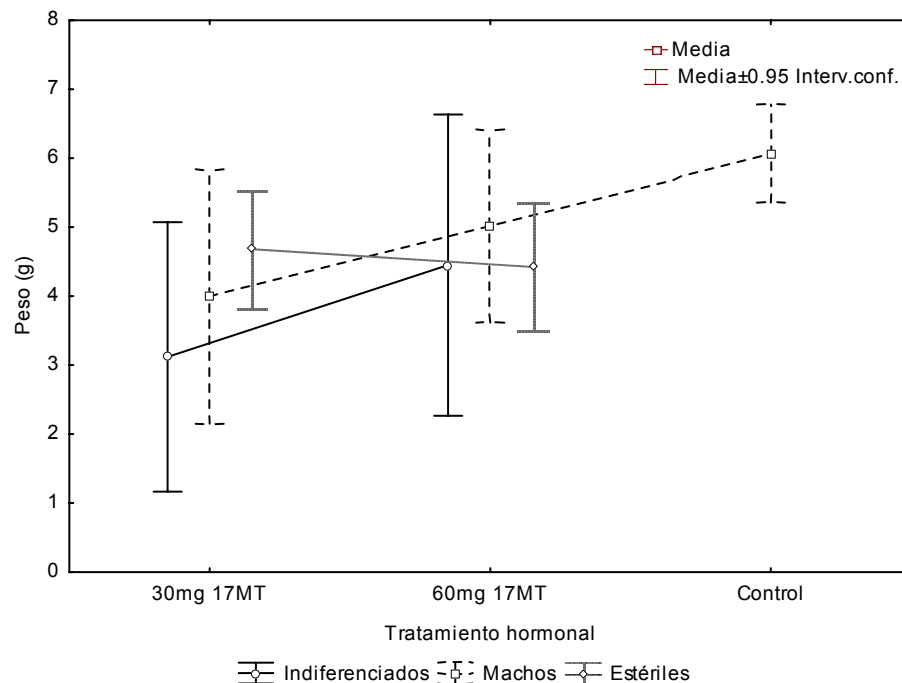


Figura 12. Comportamiento de los datos por sexo o condición respecto al peso.

La figura 12 evidencia la condición de los individuos, donde los juveniles machos presentaron una tendencia a mayor ganancia en peso, seguido por los juveniles estériles que mostraron una posición intermedia ligeramente favorecida en el tratamiento de 30 mg de la 17MT, mientras que los indiferenciados mostraron menos peso con tendencia a incrementarse en el tratamiento de 60 mg de 17MT aunque menor que cualquier otro individuo en dicho tratamiento.

Al igual que el peso, la longitud muestra la misma tendencia, ya que los individuos del grupo control presentaron las mayores tallas, por encima de los grupos de los tratamientos hormonales 30 y 60 mg de la 17MT respectivamente, y se muestran en la figura 13.

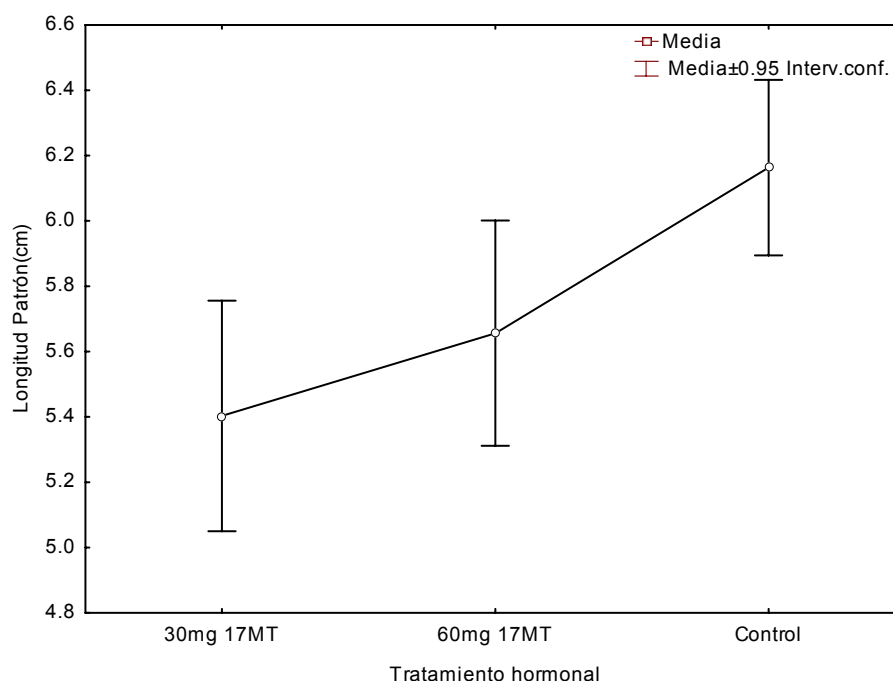


Figura 13. Comportamiento de los datos respecto a la longitud en los tres tratamientos.

7.3 Comparación del peso de los tres meses de tratamiento hormonal

Tabla 5. Peso promedio (g) obtenido durante los tratamientos hormonales

Tratamiento	Meses		
	01	02	03
Control	5.21	4.8	8.18
30 mg/kg 17 MT	3.93	3.34	5.82
60 mg/kg 17 MT	5.51	3.00	5.26

Se realizó un análisis de varianza de dos vías para los datos de peso y de longitud durante los tres meses de tratamiento (Figura 14)

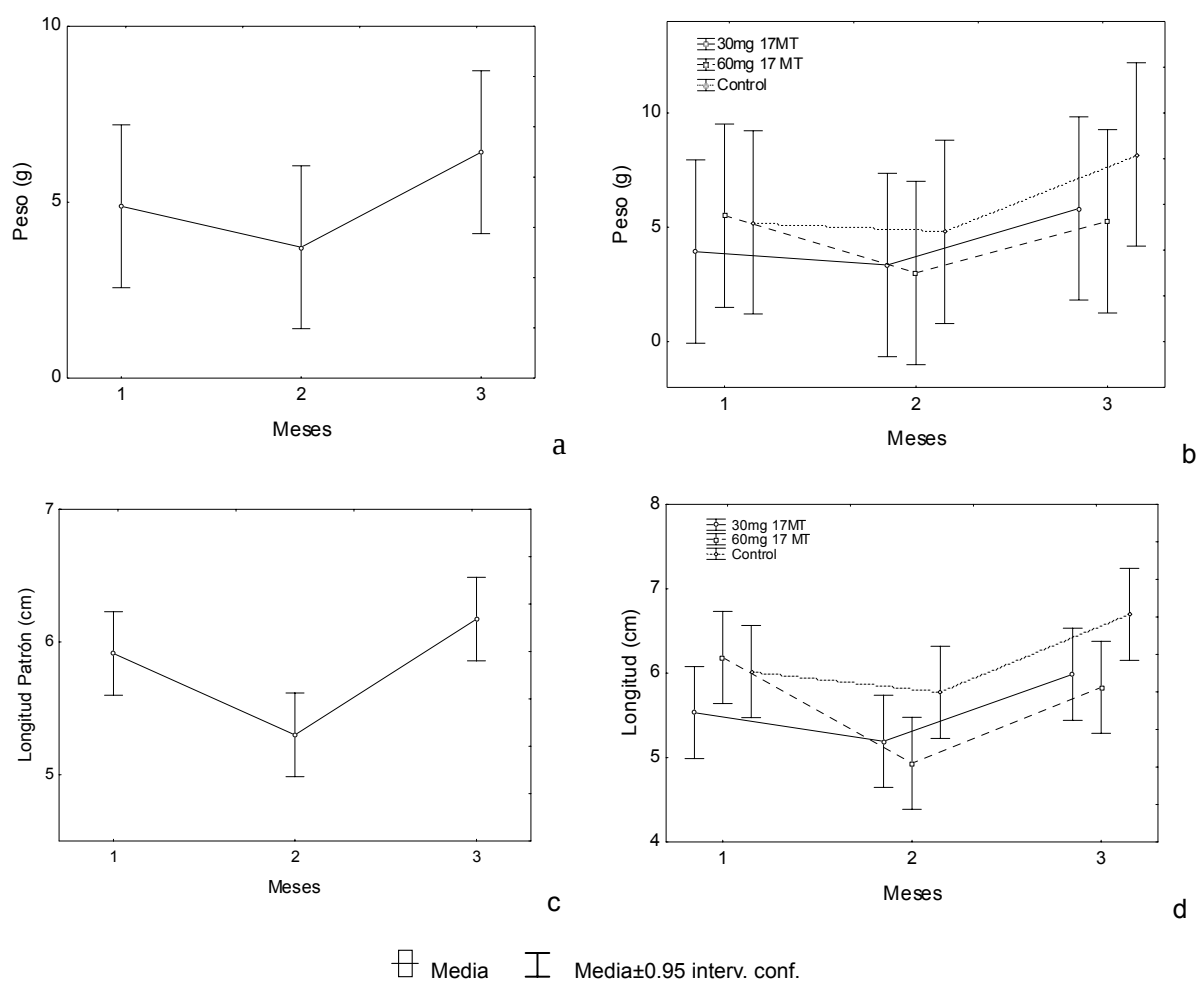


Figura 14. Crecimiento de los juveniles de cabrilla arenera durante los tres meses de tratamiento. a y b). Gráfico de peso en gramos, c y d) Gráfico de longitud patrón en centímetros.

En primera instancia a y b de la figura 14, muestran el comportamiento del peso de manera general y el comportamiento de los datos por tratamiento en relación a los tres meses del desarrollo experimental. La tabla de datos de significancia (ANEXO C) no muestra diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.26$), ni con los tratamientos con respecto a los meses ($P=0.89$). En la figura c, se observa el comportamiento general de los datos de longitud patrón, que al igual que en los datos de peso, se muestra una tendencia similar hacia el segundo y tercer mes; en la figura d, la longitud muestra nuevamente que las diferencias son solo para el control, el patrón de crecimiento es el mismo en todos los casos.

7.4 Análisis histológico y proporción sexual

A los 30 DDE, se tomaron muestras de los individuos recién transformados a juveniles, para realizar una exploración histológica de las condiciones de su desarrollo gonadal (Figura 15).

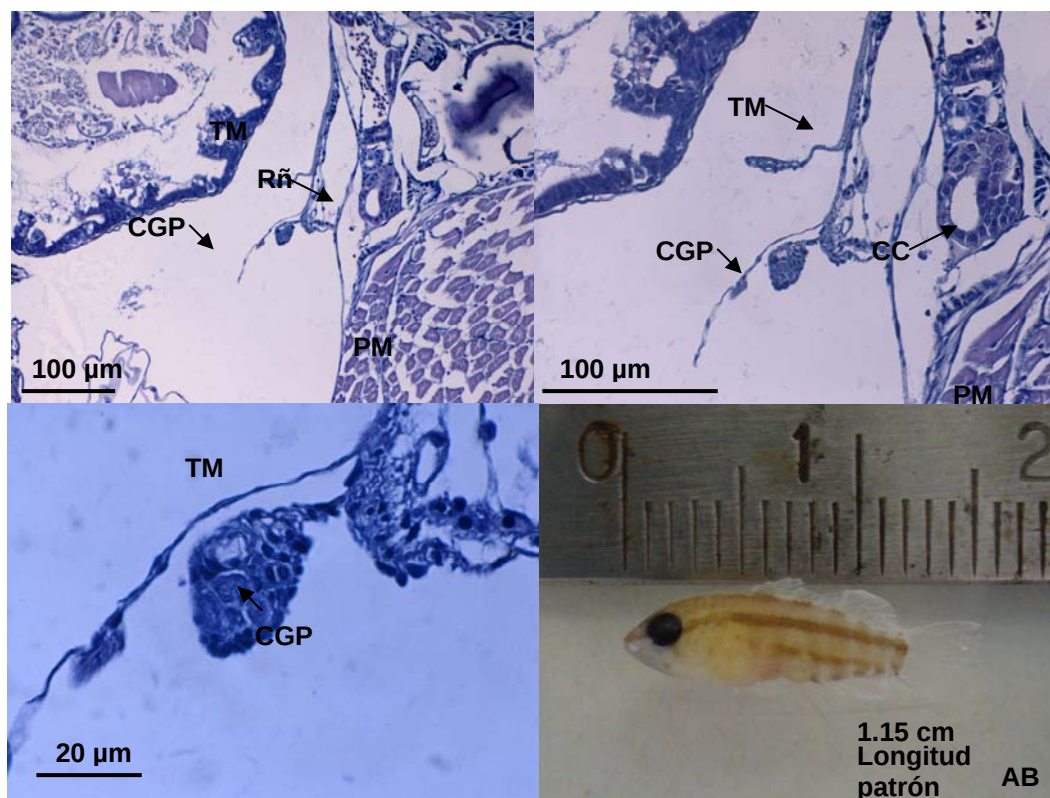


Figura 15. Micrografías tomadas de un corte transversal de la parte media de un ejemplar de *Paralabrax maculatofasciatus* a los 30 DDE, 20x, 40x y 120x respectivamente. Células germinales primordiales (CGP), Tejido mesodérmico (TM), Riñones (Rñ), Paquetes musculares (PM), Células cuboidales del riñón (CC) Técnica Azul Anciano. AB, corresponde a un juvenil de cabrilla de 30 DDE con una talla promedio de 1.15 cm de longitud patrón.

Los cortes histológicos de los individuos de 30 días, muestran el desarrollo de las crestas germinales que se observan como una prolongación de tejido mesodérmico en una banda longitudinal, formándose una agrupación de células germinales primordiales (Figura 15). Los juveniles con 30 DDE presentaron una longitud patrón de 1.15 cm, esta medida fue tomada como referencia para la especie respecto a la presencia de las primeras células germinales primordiales.

Se aplicó un análisis mensual de Friedman, para la detección de diferencias significativas en cuanto a la categoría (individuos indiferenciados, machos y estériles) encontrada entre los individuos muestreados del grupo control y entre los tratamientos de los tres meses de administración oral de la 17MT.

Siguiendo la ecuación de Friedman mencionada en el método, donde el valor crítico dado por a y b (α) obtenido en la tabla de distribución de Friedman χ_r^2 fue de 5.99. El resultado del procedimiento fue menor al valor crítico en los tres meses de tratamiento, por lo que no fue posible encontrar diferencias significativas con este análisis (véase en ANEXO D).

Para calcular la proporción de sexos en los resultados, se aplicó una prueba de Chi-cuadrada (X^2) a los datos obtenidos de las observaciones histológicas. Se generaron las tablas de contingencia correspondientes a la evaluación de cada mes para calcular las frecuencias esperadas y a partir de dichas frecuencias, se calculó Chi-cuadrada, donde la sumatoria fue comparada con el valor crítico obtenido de las tablas de distribución de la misma, a 0.95 de intervalo de confianza, 4 y 6 grados de libertad para los tres meses de tratamiento y al décimo mes respectivamente; se encontraron diferencias significativas $P < 0.05$ en cada mes evaluado, y se detectaron los tratamientos a los que se debieron tales diferencias (véase en ANEXO E). Finalmente se obtuvo la siguiente composición (Tabla 6):

Tabla 6. Proporción sexual obtenida en juveniles de la cabrilla arenera durante los tres meses de tratamiento con la 17MT (en cada caso n=15).

Composición de sexos									
Tratamiento	Primer mes			Segundo mes			Tercer mes		
	Indiferenc.	Macho	Estéril	Indiferenc.	Macho	Estéril	Indiferenc.	Macho	Estéril
Control	0(b)	15 (a) 100%	0(a)	0(b)	15(a) 100%	0(a)	0(b)	15(a) 100%	0(a)
30 mg/kg 17 MT	2(b) 13.3%	5 (b) 33.3%	8(b) 53.4%	2(b) 13.3%	2(b) 13.3%	11(b) 73.4%	2(b) 13.3%	0(b)	13(b) 86.7%
60 mg/kg 17 MT	1(b) 6.7%	5(b) 33.3%	9(b) 60%	4(b) 26.7%	6(b) 40%	5(b) 33.3%	0(b)	1(b) 6.7 %	14(b) 93.3%

Las letras distintas (a, b) presentan diferencia significativa $P < 0.05$ evaluada con X^2 .

En la tabla 6, se observa que las diferencias se debieron básicamente al grupo control en los tres meses de tratamiento, esto es debido a que el grupo control presentó un 100 % de machos de la totalidad de individuos muestreados, mientras que los tratamientos presentan categorías distintas como individuos indiferenciados y en su mayoría estériles (Figuras 18, 20 y 23). Para el tercer mes (Figura 27) se observa una tendencia a causar la esterilidad de los tratamientos de 30 y 60 mg de la 17MT. De hecho, cabe mencionar que en el caso del tratamiento de 30 mg de la 17MT, se mostró desde el primer mes una mayor proporción de organismos estériles 33.3 % que va en aumento conforme se prolonga el tiempo de exposición hacia el tercer mes obteniéndose el 86.7 % de esterilidad de la población; asimismo el tratamiento de 60 mg de la 17MT mostró la misma tendencia y al culminar el tratamiento presentó el 93.3 % de esterilidad.

Las figuras 16 y 17 mostraron el estado de desarrollo de las gónadas al primer mes de haber iniciado el tratamiento hormonal. En la figura 16 de 30 mg, se observó una gónada poco desarrollada donde es posible diferenciar el sexo ya que se muestra el inicio de la actividad testicular. En el control (Figura 17), se observa claramente la disposición de las gónadas pareadas pendiendo de tejido mesodérmico adyacente al riñón, también se observa un evidente inicio de actividad testicular, ya que la gónada más cercana al riñón presenta espermatogonias y espermatocitos. La gónada posterior muestra un tejido germinal en desarrollo, con un

evidente lumen testicular, que se observa como un espacio vacío en el interior de tejido. En ambos casos se muestra un estadio de proliferación.

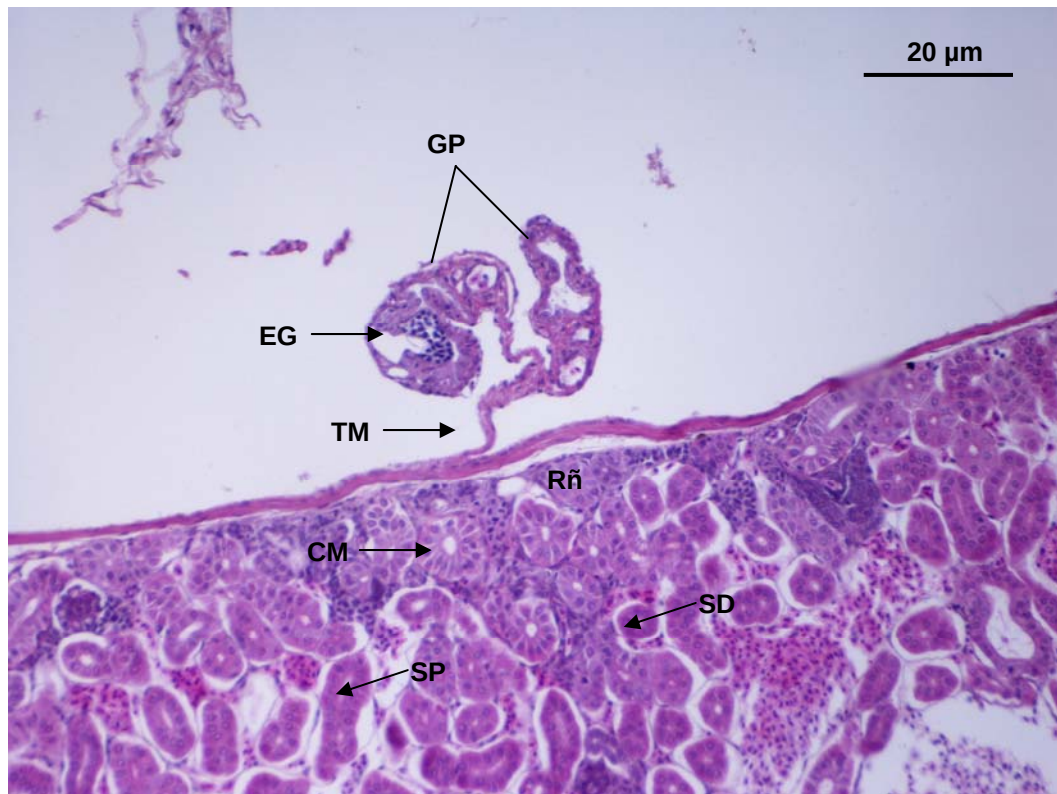


Figura 16. Micrografía de un corte transversal de un individuo de cabrilla arenera en el primer mes correspondiente al tratamiento de 30 mg de la 17MT, 40x. Estadio de proliferación. Gónada pareada (GP), Primeras espermatogonias (EG), Tejido mesodérmico (TM), Riñón (Rñ), Conducto mesonéfrico (CM), Segmento proximal (SP), Segmento distal (SD). Técnica de H-E.

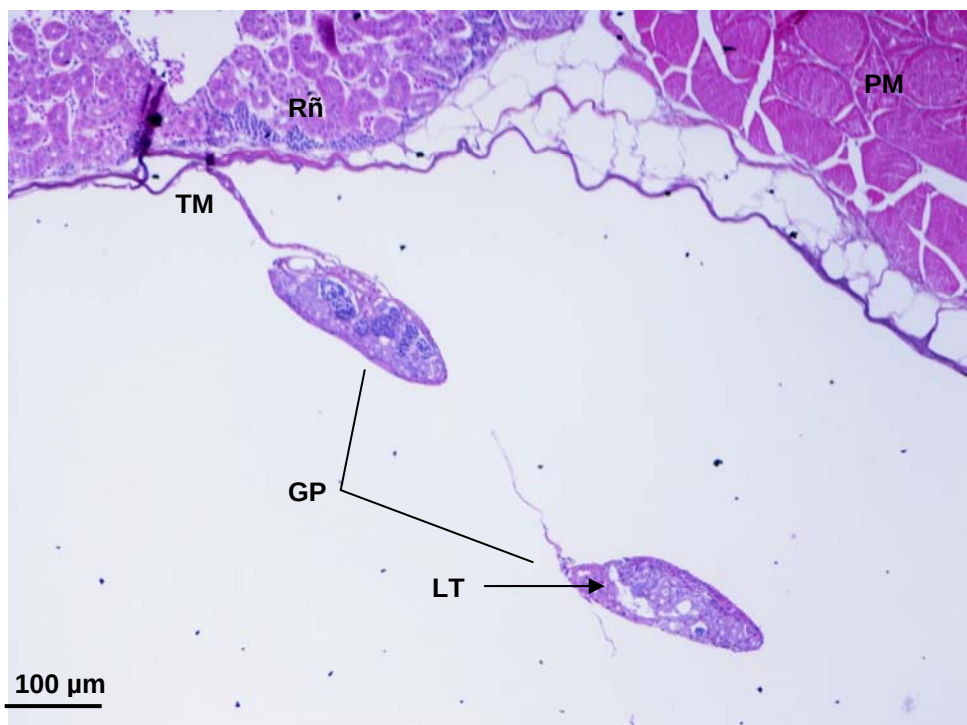


Figura 17. Micrografía de un corte transversal de un individuo de cabrilla arenera en el primer mes correspondiente al grupo control, 10x con 1.2 de aumento. Estadio de proliferación. Gónada pareada (GP), Lumen testicular (LT), Tejido mesodérmico (TM), Riñón (Rñ), Paquetes musculares (PM). Técnica de H-E.

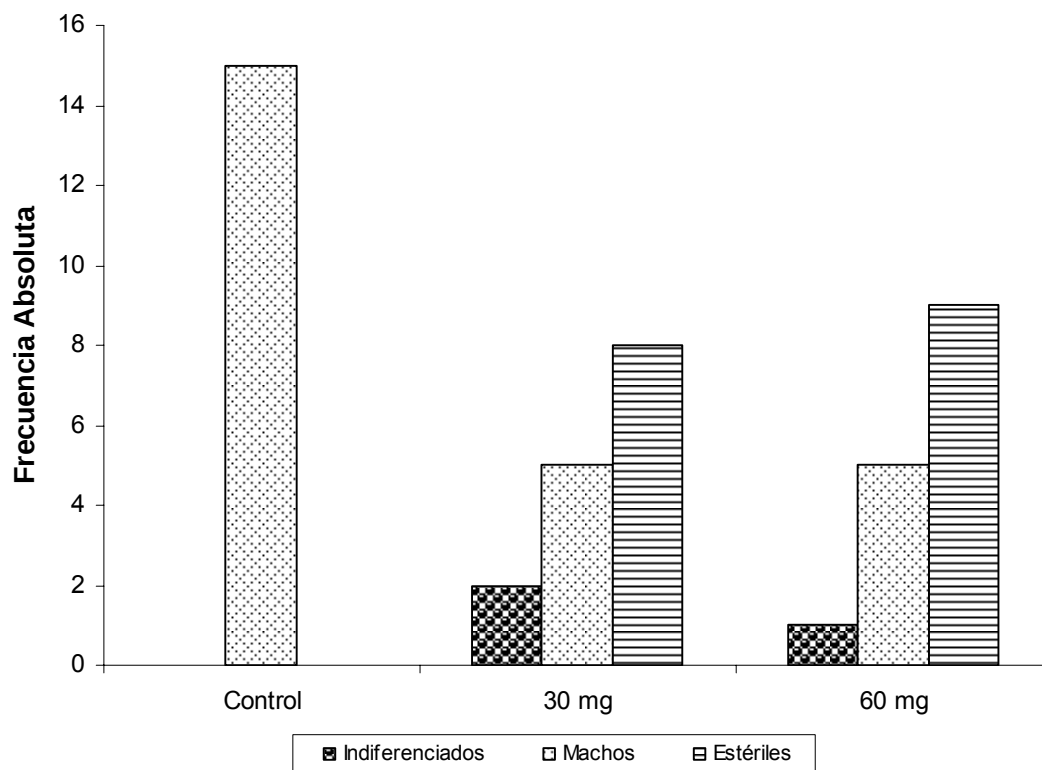


Figura 18. Proporción de sexos de la cabrilla arenera al primer mes de tratamiento.

En el segundo mes, fue posible observar más claramente a las gónadas masculinas en la mayoría de los grupos y tratamientos, debido a que se encontraban notablemente más desarrolladas (Figura 19), donde fue posible observar intensa actividad celular en todas las etapas de desarrollo: espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermátides, espermatozoides y se aprecian células de Leydig en los espacios intersticiales. Se aprecia la capa de tejido conjuntivo fibroso que rodea al testículo (túnica albugínea) del cual parten las trabéculas al interior del testículo, proporcionándole un soporte adecuado. Se presenta un epitelio germinal continuo, células epiteliales de forma cúbica en la membrana basal. Se estima un estadio de maduración temprana.

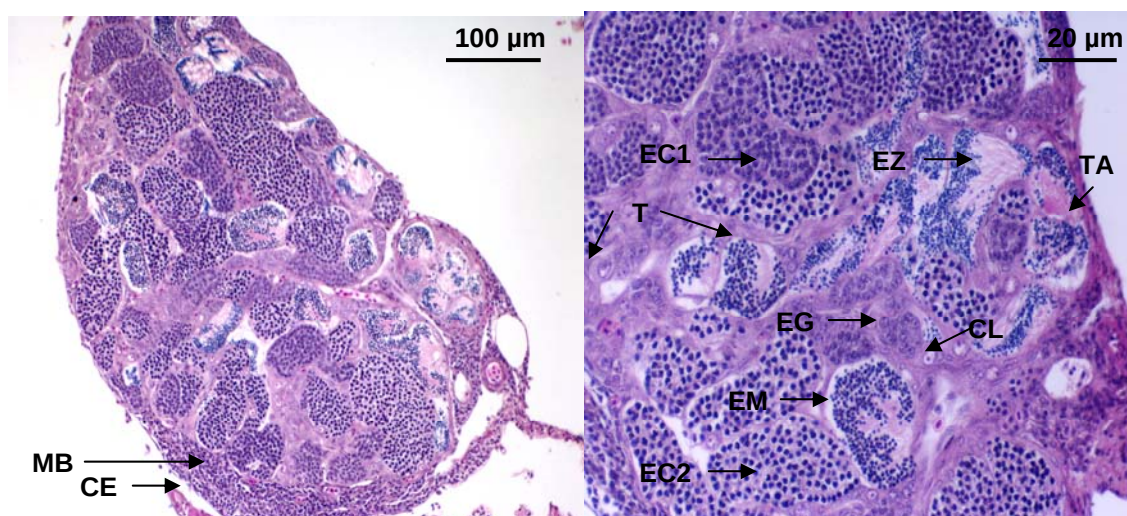


Figura 19. Gónada masculina de un individuo de cabrilla arenera al segundo mes correspondiente al tratamiento de 60 mg de la 17MT, 20x y 40x respectivamente. Maduración temprana. Membrana basal (MB), Células epiteliales (CE), Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ) Célula de Leydig (CL), Túnica albugínea (TA), Trabéculas (T). Técnica de H-E.

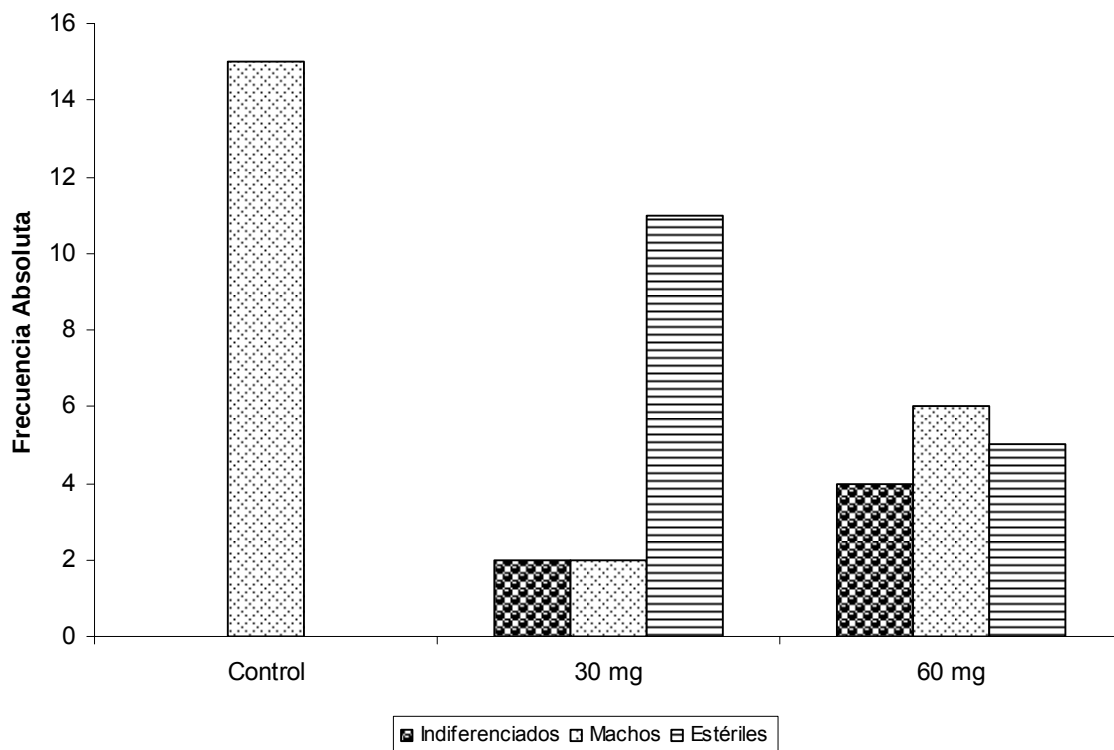


Figura 20. Proporción de sexos de la cabrilla arenera al segundo mes de tratamiento.

En las observaciones realizadas durante el tercer y último mes de tratamiento se encontraron muestras con gónadas de gran tamaño, en su mayoría correspondientes al grupo control ya que en 30 mg y en particular 60 mg de la 17MT, presentaron gónadas menos desarrolladas y en algunos casos ausentes. La figura 21, muestra la ubicación anatómica donde la gónada fue localizada, en este caso se refiere a un grupo control que presenta tejido testicular en estado de maduración temprana. La figura 22, muestra las gónadas correspondientes a los tratamientos hormonales, donde se observan gónadas masculinas menos desarrolladas en tamaño pero con el mismo nivel de maduración que el control y los casos de esterilidad por inhibición en el desarrollo de la gónada.

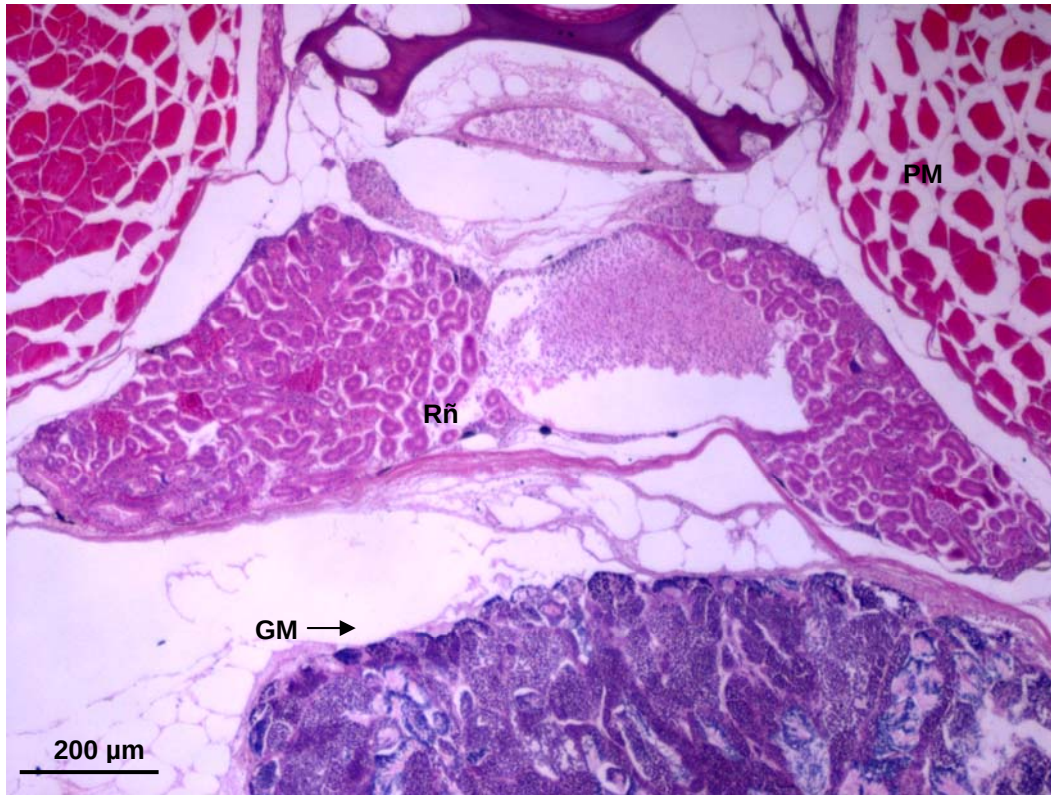


Figura 21. Gónada masculina de un individuo de cabrilla arenera al tercer mes correspondiente al grupo control, 8x. Maduración temprana. Riñón (Rñ), Paquetes musculares (PM), gónada masculina (GM). Técnica de H-E.

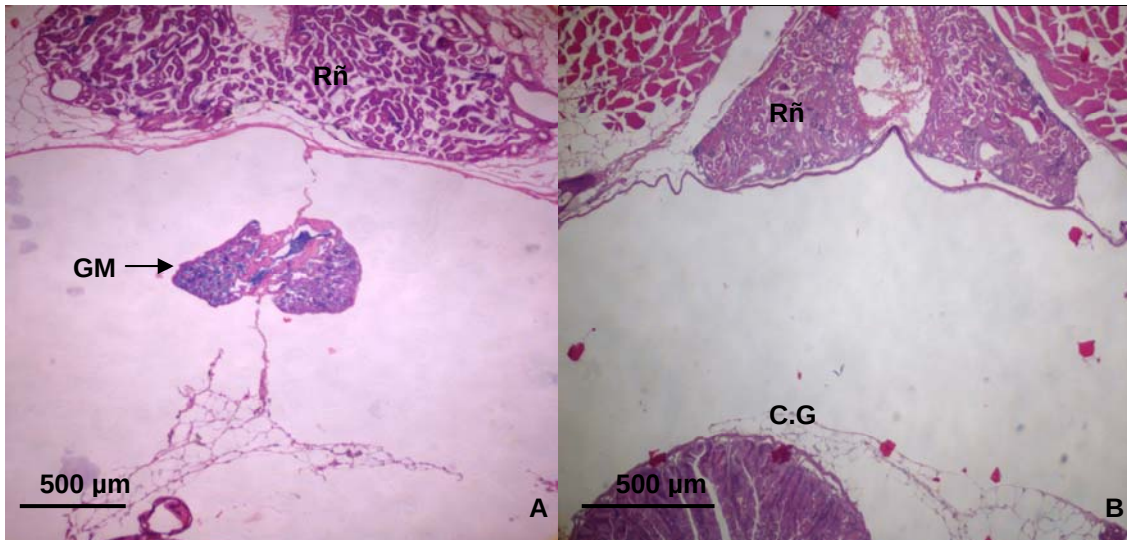


Figura 22. A). Muestra una gónada masculina (GM) menos desarrollada en tamaño al tercer mes correspondiente a 30 mg de la 17MT, 4x a 1.2 de aumento, Maduración temprana. Riñón (Rñ). B). Muestra inhibición en el desarrollo de la gónada correspondiente al tercer mes en 60 mg de la 17MT, 4x a 1.5 de aumento. Riñón (Rñ), Criptas gástricas (CG). Técnica de H-E.

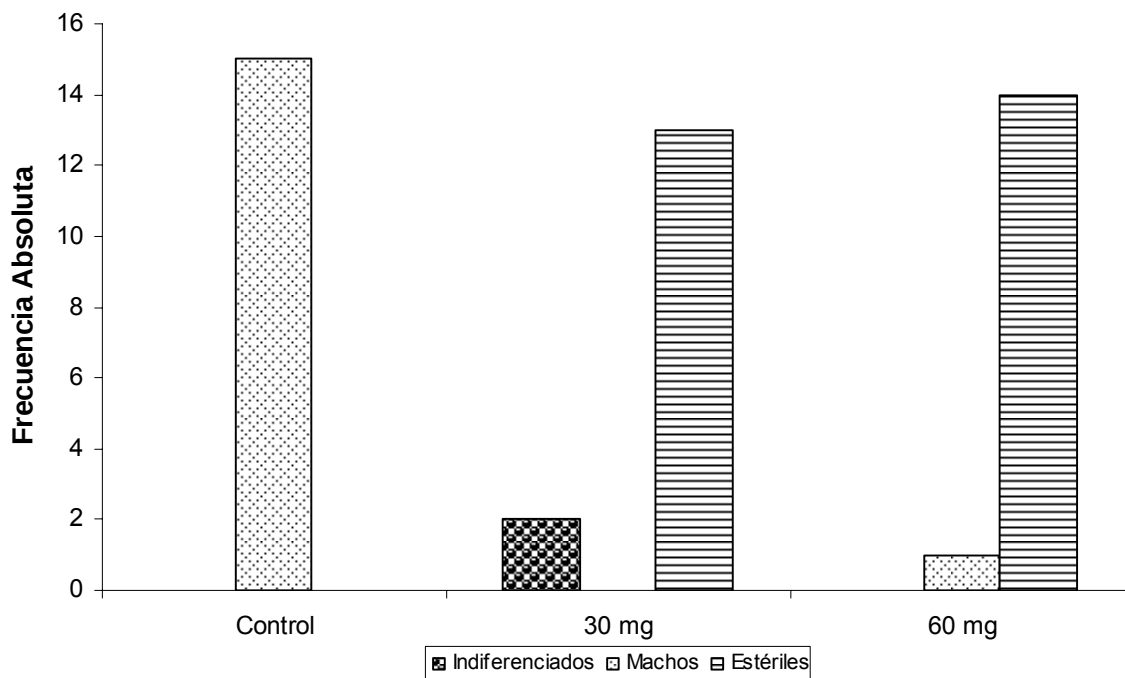


Figura 23. Proporción de sexos de la cabrilla arenera al tercer mes de tratamiento.

El análisis histológico de las gónadas, mostró exclusivamente tejido testicular, tanto para el grupo control como para las gónadas poco desarrolladas encontradas en los tratamientos de 30 y 60 mg de la 17MT. Es posible observar gónadas con gran actividad testicular en todos los niveles de desarrollo, para el control y los tratamientos.

Para las muestras del tercer mes se utilizaron una técnica de tinción topográfica y otra histoquímica. Estas técnicas permitieron la observación y diferenciación de estructuras y tipos celulares. En la técnica de Feulgen, el ADN es hidrolizado por ácido clorhídrico a 60 grados centígrados generando una ruptura de enlaces que a su vez producen aldehídos libres, éstos últimos, reaccionan con la fucsina básica del reactivo de schiff. Esa reacción positiva se ve en las figuras 24 y 26 con una coloración morado-azul en los núcleos celulares, presentando el resto de las estructuras en color verde mar.

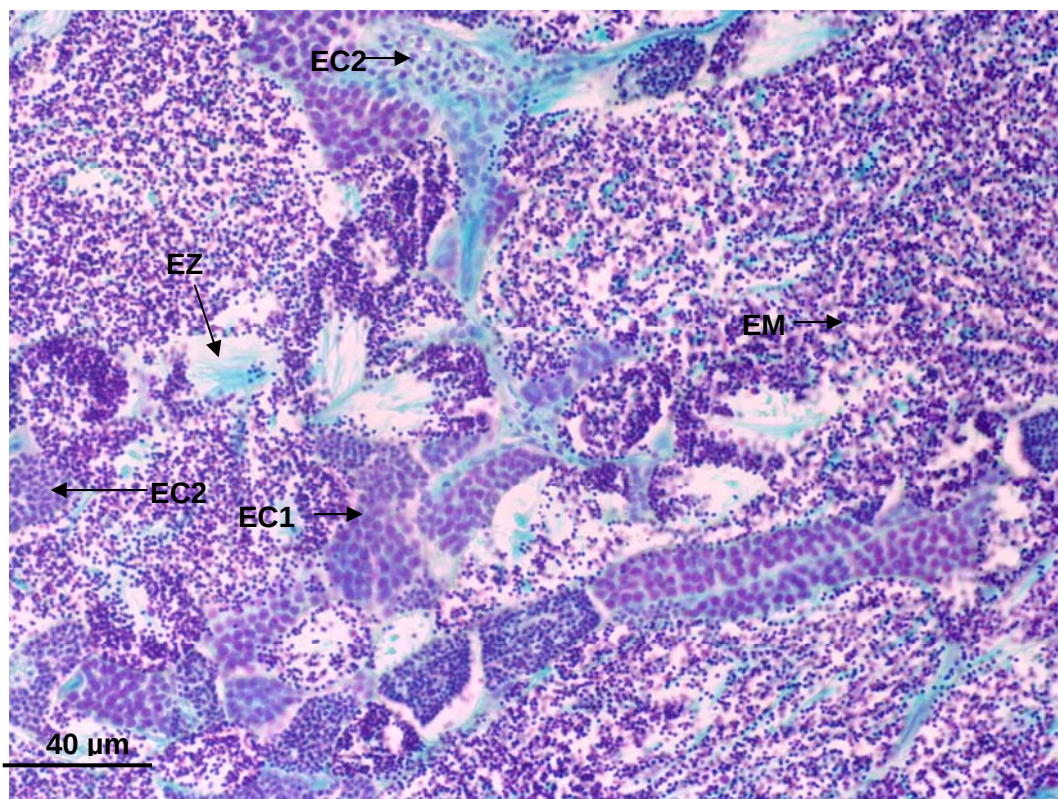


Figura 24. Gónada masculina de las muestras tomadas en el tercer mes. Grupo control, 60x. Maduración media. Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Eritrocitos nucleados (E). Técnica de Feulgen.

La figura 24 corresponde al tercer mes de tratamiento y se observa un tejido testicular en un estadio de maduración media. El epitelio germinal continuo empieza a sustituirse por el discontinuo y se reduce el número de espermatogonias. Se observan los núcleos celulares teñidos de color morado. La figura 25, del tercer mes de tratamiento, presenta un estadio de maduración temprana, manteniéndose en mayor proporción epitelio germinal continuo.

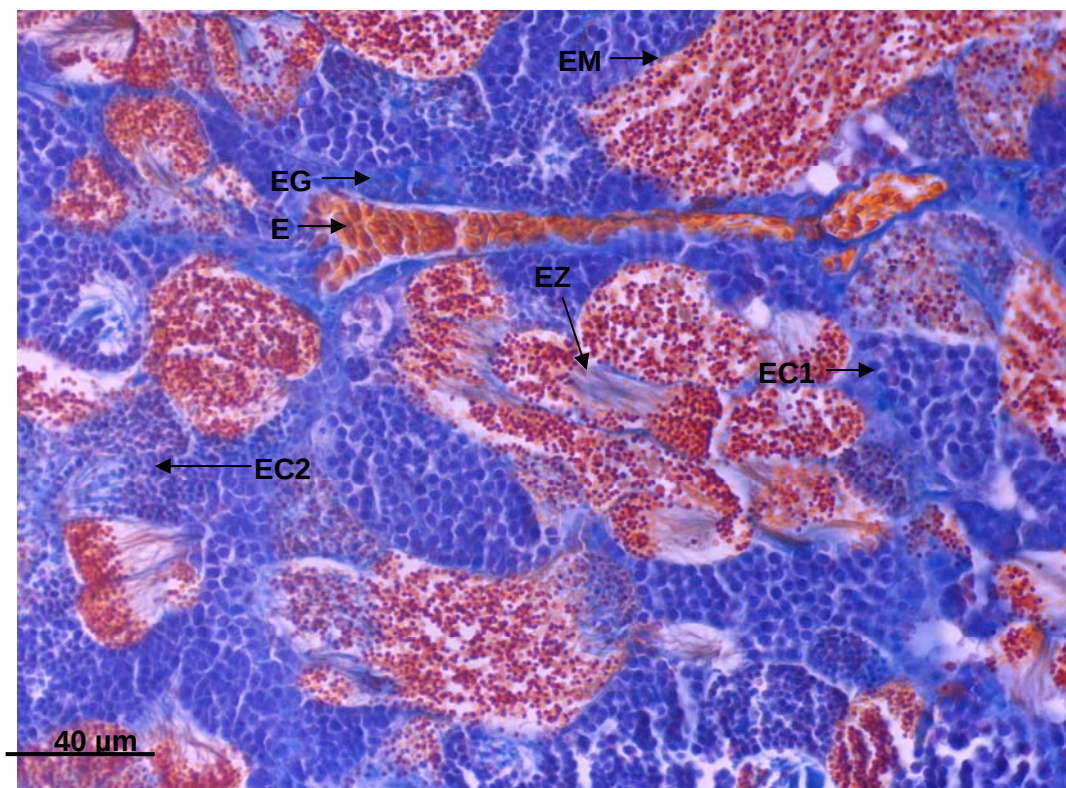


Figura 25. Gónada masculina del tercer mes. Tratamiento de 30 mg de la 17MT, 40x. Maduración temprana. Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Eritrocitos nucleados (E). Técnica Tricrómica de Mallory.

Por otro lado, la coloración de la técnica Tricrómica de Mallory (Figuras 25, 27 y 28), aplicada a las primeras fases de desarrollo de las células sexuales, que comprende desde la fase de espermatogonias hasta espermatocitos secundarios, se tiñen de color azul (parte inactiva del tejido) y las células más desarrolladas como las espermátides y los espermatozoides maduros, se tiñen de color ocre (tejido activo), estas afinidades presentadas por las células hacia los colorantes resultan útiles para la identificación de las fases y estadios de madurez.

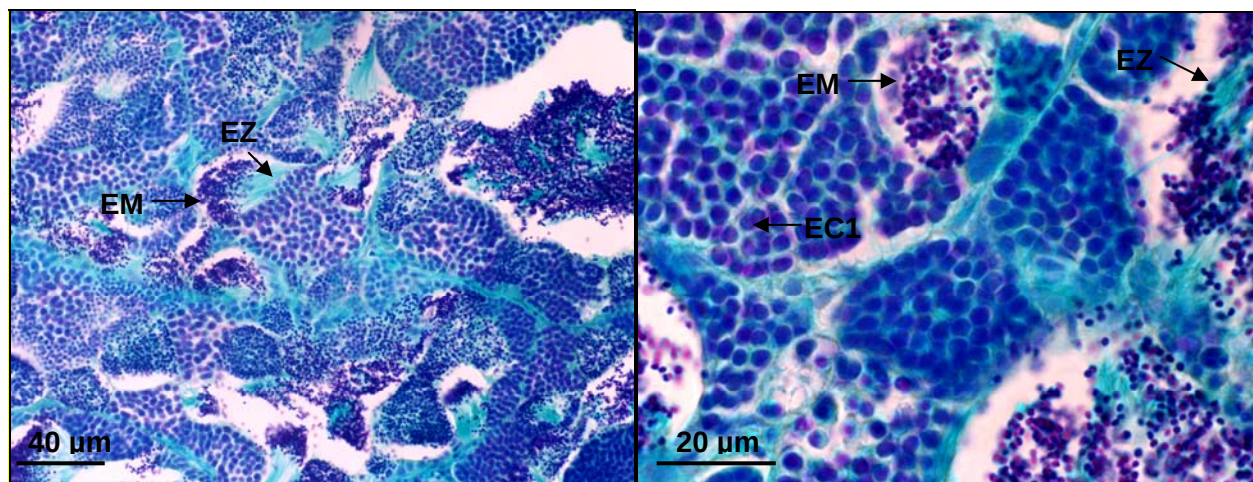


Figura 26. Gónada masculina de muestras extraídas al tercer mes. Tratamiento de 30 mg de la 17MT, 40x y 120x respectivamente. Maduración media. Espermatocitos primarios (EC1), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Técnica de Feulgen.

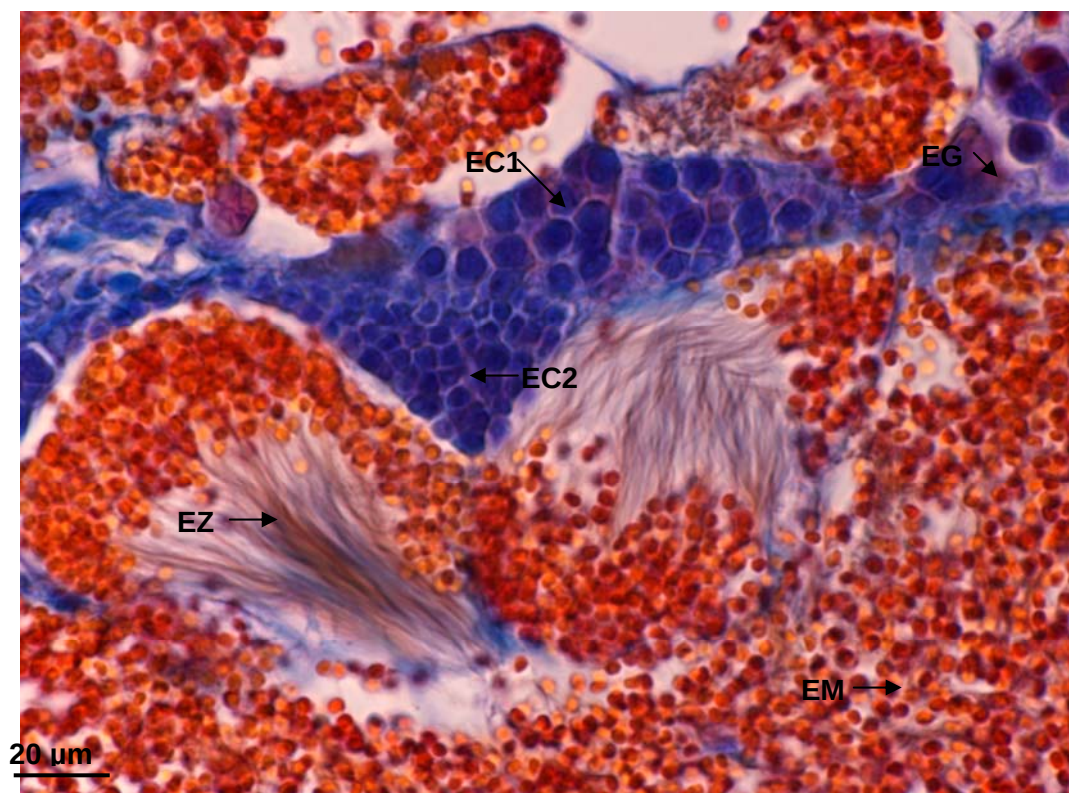


Figura 27. Se observa gónada masculina con actividad normal tercer mes. Tratamiento de 30 mg de la 17MT, con un acercamiento a 120x. Maduración media. Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Técnica Tricrómica de Mallory.

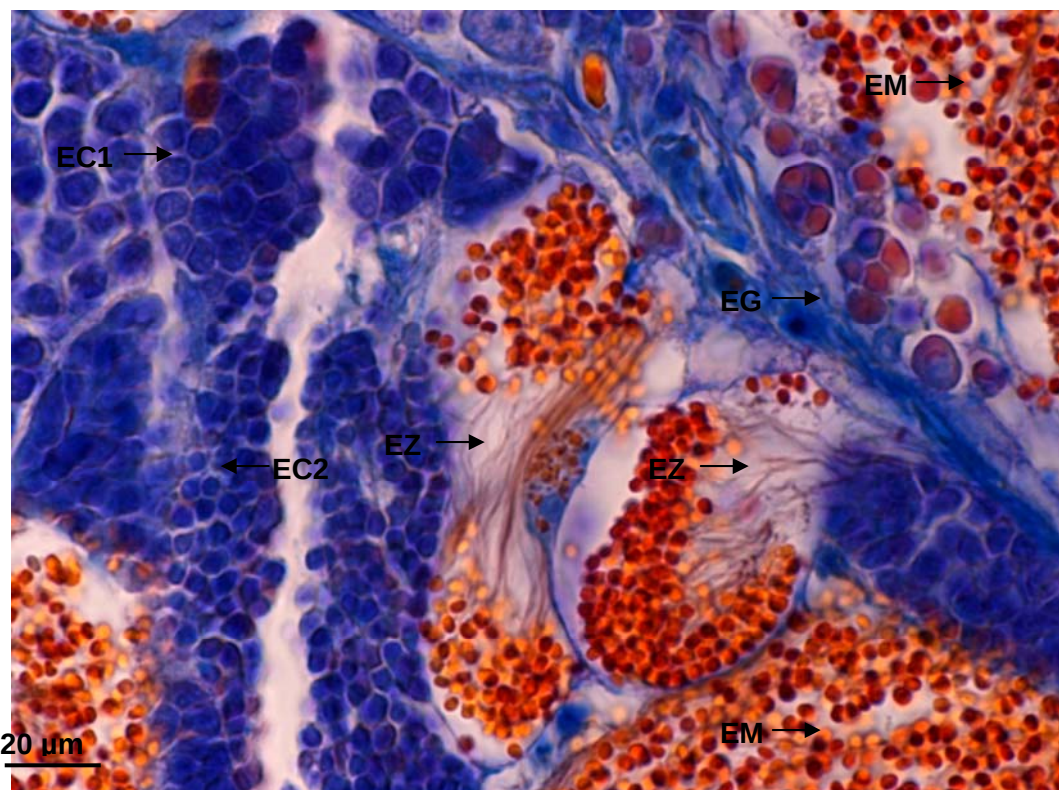


Figura 28. Gónada masculina correspondiente al muestreo del tercer mes. Tratamiento de 60 mg de la 17MT, 120x. Maduración media. Espermatogonias (EG), Espermatocitos primarios (EC1), Espermatocitos secundarios (EC2), Espermátides (EM), Espermatozoides (EZ), Técnica Tricrómica de Mallory.

Los resultados se muestran consistentes y ellos es posible observar que en los tratamientos se presentó una masculinización seguida por una esterilización expresada en una inhibición total del desarrollo de la gónada, lo cual permite asumir que el tratamiento hormonal con las concentraciones empleadas produjo como resultado definitivo la masculinización y esterilización con 90 días de tratamiento hormonal.

7.5 Análisis de residualidad de la 17 MT en el agua del sistema de crianza

La dilución etanólica de 1/10, para la determinación del límite de detección mínima del método tuvo una respuesta intensa no cuantificable. Las diluciones de 1/50, 1/100 y 1/1,000, muestran que la 17MT presenta un tiempo de retención promedio de 17.38 minutos. El resto de picos se atribuyen a impurezas del disolvente (etanol), puesto que ellos no aumentan o reducen su área o altura en relación a la

cantidad de muestra empleada. De acuerdo a estos resultados, se observa que a una concentración tan baja como 0.1 µg/l (eq. 100 ng) fue posible detectar a la 17MT mediante el sistema cromatográfico (véase cromatogramas en ANEXO F).

Al realizar el análisis de las muestras de agua, el método no detectó presencia de la hormona 17MT en ninguno de los dos casos tanto para la cisterna que desde un inicio se consideraba libre de la 17MT, así como para el sifón del tanque donde se estaba empleando la mayor concentración, por lo que se suponía que eventualmente se detectarían residuos de la misma en estas muestras. Cabe mencionar, que al determinar el límite de detección mínima del método que fue de 0.1 µg/l, lo que en todo caso, si se hubiesen llegado a presentar residuos de la 17MT, éstos se encontrarían en cantidades menores a 0.1 µg/l, puesto que sería indetectable para el método (ANEXO F).

En el análisis de adiciones y recuperaciones de la 17MT en el alimento se determinó que el método podría subestimar la concentración de la hormona en muestras complejas hasta en un 33%, esto puede ser observado en los cromatogramas del ANEXO F.

8. DISCUSIÓN

8.1 Exploración histológica inicial

Al realizarse la exploración histológica en los 30 DDE, fue posible detectar la ubicación de las crestas germinales. Sánchez-Gallegos (2007), reportó que en juveniles de 32 DDE, se observan un conjunto de células formando una banda longitudinal de epitelio mesodérmico a un lado del mesenterio dorsal, y define como el inicio del desarrollo de las crestas germinales, las cuales incrementan de tamaño y área conforme los juveniles aumentan en talla. La gónada indiferenciada consta de una estructura superficial denominada corteza, y cordones formados por células compactadas en el interior denominado médula. Las células germinales primordiales (CGP) en gónadas indeterminadas, originalmente no poseen sexo, su evolución depende de su localización en los territorios sexuales mencionados y tanto en testículo como en ovario, poseen rasgos citológicos característicos y una forma única de los sitios antigénicos de los sexos, que en células somáticas se encuentran ausentes (Devlin y Nagahama, 2002).

Estos rasgos son consistentes debido a que las células germinales primordiales son similares en los dos sexos, las cuales permanecen indiferenciadas e indeterminadas hasta la influencia de hormonas y el desarrollo de la gónada, que las transforma en espermatogonias u oogonias (Devlin y Nagahama, 2002). Las CGP pueden ser detectadas por técnicas inmunohistoquímicas que por razones logísticas no fueron posibles de realizarse en este trabajo. Estas técnicas han sido utilizadas en el trabajo de Devlin y Nagahama (2002) y actúan localizando la proteína que codifica al gen llamado VAS que se encuentra solo en células germinales de ambos sexos. En el presente estudio, fue posible ubicar a las CGP mediante técnicas topográficas, observando su forma casi esférica y por su característica ubicación ya que, aparecen dispersas entre las células del epitelio mesodérmico y no se observan en la disposición epitelial de las células mesodérmicas típicas.

8.2 Determinación de la edad inicial de aplicación, duración del tratamiento hormonal y la dosis

Fue importante para este trabajo hacer una exploración inicial del estado de desarrollo sexual de los organismos para poder determinar el tiempo adecuado de inicio del tratamiento hormonal, ya que las observaciones realizadas en otros estudios sobre tratamiento hormonal para el control sexual (Omoto *et al.*, 2002) han indicado que es posible inducir a la inversión sexual, siempre y cuando el tratamiento se inicie previo a la diferenciación morfológica de las gónadas. Las observaciones realizadas en este trabajo a los 30 DDE, se detectaron las primeras CGP, así en esa etapa (con una longitud patrón de 1.15 cm) fue posible determinar el tiempo adecuado para iniciar el tratamiento hormonal e inducir efectivamente a la masculinización.

En cuanto a los tiempos de exposición al tratamiento con hormona, estos fueron determinados con base a los tiempos utilizados para otras especies como *Dicentrarchus labrax* Chatain *et al.* (1999) en el que se estableció el tratamiento hasta 90 días. Por otra parte Pandian y Sheela (1995), mencionaron que los peces hermafroditas como *Epinephelus fargo*, miembro de la familia Serranidae, al igual que la cabrilla posee una condición protogínica, y dentro de su estrategia reproductiva, funciona como hembra durante los primeros siete años de su vida y subsecuentemente, se convierte en macho. Pandian y Sheela (1995), sugirieron que este tipo de especies es común que requieran un tratamiento con una duración mayor a 150 días. No obstante, se decidió probar los tiempos que ya habían generado resultados satisfactorios, con la finalidad de encontrar en uno de ellos, el tiempo de tratamiento indicado. Los resultados fueron observados desde el primer mes, por lo que se puede determinar como 30 días de tratamiento, el tiempo mínimo necesario para masculinizar e incluso esterilizar en los tratamientos de 30 y 60 mg de la 17MT el 53 y 60 % respectivamente de la población de la cabrilla arenosa.

La hormona utilizada en este trabajo, la 17MT ha mostrado en otros estudios que a una concentración entre 5-10 mg/Kg induce a la masculinización en especies como

la carpa y la tilapia (Omoto *et al.*, 2002), al igual que con salmones, concentraciones de entre 1, 3 y 9 mg/Kg han generado el 100 % de masculinización (Solar *et al.*, 1984). Esto si bien se ha presentado en especies dulceacuícolas y en especies marinas se ha observado que concentraciones entre 30 y 60 mg/Kg han dado resultados positivos, estableciéndose dichas dosis como parte indispensable de un efectivo proceso de masculinización total y definitivo (Chatain *et al.*, 1999).

En general, la dosis óptima requerida para inducir a una completa reversión sexual de todos los individuos es específica de cada especie, aunque en algunos casos cierta dosis puede ser administrada con éxito sobre la masculinización de una serie de especies (Pandian y Sheela, 1995), sin embargo, este no fue el caso para este trabajo, ya que, tomando como punto de referencia la información reportada para especies marinas, los resultados obtenidos sugieren que la dosis adecuada se encuentra por debajo de las utilizadas en este trabajo, ya que en 30 mg/Kg que fue la menor dosis probada se obtuvieron procesos de esterilización incluso desde el primer mes y como mencionaron Pandian y Sheela (1995), se debe entonces determinar la dosis óptima para la especie en estudio, la que sin duda se muestra como una especie fisiológicamente más sensible a las alteraciones en su sistema endócrino, que la convierte en un organismo con necesidades específicas y diferentes a cualquier otro grupo o familia de peces marinos. Si bien, lo anterior, proporciona noticias alentadoras al promover la reducción en la inversión económica para la producción de cultivos monosexos de la cabrilla arenosa a futuro, ya que se verán reducidas las dosis de tratamientos y probablemente también los tiempos de aplicación, y por ende los costos. A la vez, estos resultados generan la expectativa de nuevos estudios, para definir la dosis adecuada a pequeños intervalos entre concentraciones por debajo de 30 mg/Kg.

8.3 Producción de individuos machos en el grupo control

Según Kohler (1997), en la mayoría de los peces teleósteos los machos crecen más rápido que las hembras. Lo anterior es una información que fue imposible

evaluar en este trabajo, ya que en los controles se registraron solo individuos machos. La cabrilla arenosa es una especie hermafrodita protogínico, por tal motivo era de esperarse que los resultados generados para el grupo control, se presentaran si no en su totalidad al menos un alto porcentaje de individuos hembras, sin embargo, todas las preparaciones histológicas incluso las determinaciones visuales de las gónadas extraídas al décimo mes para los grupos controles, fueron convincentes de la presencia exclusiva de tejido testicular. Existen dos posibles alternativas que pudieran explicar este fenómeno en el grupo control, las cuales se discutirán a continuación.

Primeramente, de acuerdo con lo observado por Shapiro (1989), en estos casos es aplicable un modelo sobre el comportamiento poco común en especies hermafroditas secuenciales; este modelo está basado en que las diferentes etapas del desarrollo del organismo pueden verse afectadas por una variación en la duración y comportamiento de las mismas, en condiciones diversas como una respuesta alternativa. Esta respuesta se basaría en la producción de machos en lugar de hembras, en los cuales, cambios ambientales traigan consigo un crecimiento general que beneficie a la población, colocaría a la condición de macho con ventajas en la tasa de desarrollo y un mayor éxito reproductivo en comparación con las hembras.

Aunado a lo anterior, se puede predecir la existencia de machos con estrategias reproductivas alternativas incrementando el éxito reproductivo de la población (Shapiro, 1989). Estas estrategias alternativas se generarían mediante la reducción de la fase femenina del ciclo de vida de algunos individuos dando origen a machos primarios. Estas premisas se aplican a poblaciones de peces de hermafroditas secuenciales y de esta manera se explica la existencia de diandria en algunos casos (Lluch-Cota, 1995).

En este trabajo, los juveniles se mantuvieron en condiciones experimentales y controladas de laboratorio, totalmente distintas al medio silvestre donde

probablemente la especie mostró una respuesta alternativa. Es posible que esa respuesta se haya representado como una estrategia reproductiva de la especie suprimiendo el sexo inicial de su naturaleza protogínica, produciéndose solo machos primarios en toda la población. Shapiro (1989), también mencionó que en los peces que son hermafroditas secuenciales, el sexo es una expresión inducida por los patrones sociales y que la expresión sexual podría quedar incluso bajo control individual. Numerosos individuos de una población pueden quedar imposibilitados para la reproducción conforme la proporción sexual se desvíe más a favor de un sexo.

La segunda alternativa para explicar el fenómeno de “todos machos” en el grupo control, y probablemente la más convincente debido a las características de este estudio, es la que maneja que los juveniles del grupo control sufrieron un proceso de masculinización por exposición a la 17MT. Si bien, numerosos estudios han reportado la eliminación de la hormona en los tejidos de los peces tratados en poco menos de unas cuantas horas o días después de la última administración oral (Abucay y Mair, 1997), casi en ningún estudio se menciona la presencia de compuestos resultantes de la desnaturalización de la 17MT, que quedan circulando en el sistema de crianza. De acuerdo con Gomelsky *et. al.* (1994), la 17MT consumida por los peces puede ser transformada a través del hígado a metabolitos activos, los cuales son solubles en agua y son excretados con la bilis. También menciona que en estudios realizados con *Cyprinus carpio* se han producido altas tasas de inversión sexual a machos en los individuos del grupo control a causa de la exposición a metabolitos producidos por administración de la 17MT y que se encontraban en el sistema de recirculación.

Este mismo fenómeno es observado en tilapias, Abucay y Mair (1997), encontraron que no existía diferencia significativa entre el control y los tratamientos con 17MT, puesto que ocurrió incidentalmente una inversión sexual en el grupo control como resultado de una acumulación de metabolitos activos y/o residuos del alimento no ingerido.

De acuerdo a lo anterior, el grupo control del presente estudio fue masculinizado accidentalmente por inmersión y no por alimentación, donde el sistema de depuración con luz ultravioleta no fue suficiente para la eliminación de los metabolitos originados por la desnaturalización de la 17MT. Debido a que fue un incidente, no fue posible determinar la dosis que requirió esta inducción sexual exitosa.

8.4 Efecto de la 17 α -metiltestosterona sobre el crecimiento, masculinización y esterilización en juveniles de cabrilla arenera con 90 días de tratamiento

La hormona sufre una degradación en el tracto digestivo; Pandian y Sheela (1995), sugirieron que la pureza de la hormona varía y su solubilidad también según el solvente utilizado. En este caso, se utilizó etanol como disolvente al ser reportado en innumerables trabajos de la misma índole. Las mediciones obtenidas de peso y longitud en cada muestreo fueron procesadas estadísticamente, sin embargo para facilitar su presentación e interpretación, el paquete estadístico muestra los datos generalizados en promedios, no obstante, se debe mencionar que en los tratamientos de 30 y 60 mg/Kg de la 17MT, los datos en bruto mostraban amplia variación mientras que en el grupo control se mantuvieron homogéneos a lo largo del experimento.

Es evidente que los tratamientos no actuaron de manera uniforme en toda la población generando así variabilidad en la respuesta. De esta manera, Shapiro (1989) sugiere que cada organismo sometido a las condiciones de un mismo medio puede actuar y desarrollarse de forma individual e independiente con respecto al resto de la población. Existe otra razón por la cual nos podemos inclinar más; el problema puede radicar en los aspectos metodológicos, como la uniformidad en la distribución de la hormona en el alimento, que puede variar de manera considerable. A pesar de haber preparado el alimento mediante el proceso de aspersión y evaporación de alcohol descrito por Yamamoto (1953), algunos errores metodológicos pueden ser inevitables. Según Pandian y Sheela (1995), una distribución heterogénea de la hormona por más imperceptible que esta sea, puede

ocasionar una variación en el tamaño de las partículas de alimento, y causar una diferencia en el consumo de alimento y por lo tanto una diferencia también en el consumo de hormona, expresándose en una variabilidad de tallas y pesos de los peces. Estos son aspectos importantes que deben ser analizados cuidadosamente y corregidos para futuras pruebas.

La literatura sobre estudios realizados por otros investigadores relacionados con este trabajo, muestra en algunos de ellos resultados distintos y otros comparables a lo observado en este ensayo, tanto para especies marinas como dulceacuícolas. Tal es el caso del trabajo preliminar de Al-ablani y Phelps (1997), sobre la masculinización de la mojarra negra *Pomoxis nigromaculatus* por tratamiento hormonal, el cual resultó un éxito en su primer intento, registrando una alta producción de machos gracias a la administración oral de la 17MT a una concentración de 60 mg/Kg de alimento.

En un trabajo realizado con la especie *Betta splendens*, se obtuvieron datos con tendencias similares a las del presente estudio; Kirankumar y Pandian (2002), sometieron a *B. splendens* a tratamiento hormonal mediante inmersiones con la 17MT a 2 DDE y 8 DDE diferentes tiempos de exposición y concentraciones. El grupo que fue tratado desde el inicio se masculinizaron al 100 %, sin embargo, mostraron un crecimiento más lento generándose tallas de 3.5 cm comparadas con 6.0 cm correspondientes a los machos normales. El grupo que estuvo sometido más tarde al tratamiento, tuvo 5.4 cm de longitud. Estos autores, además tuvieron la oportunidad de evaluar capacidad reproductiva encontrando que además de los defectos morfológicos ambos grupos mostraron disfunciones como un decremento en la cantidad de espermatozoides y en la movilidad de los mismos y por ende defectos de comportamiento durante el desove que generó bajas en la fecundidad.

El efecto de la 17MT en la masculinización de la cabrilla arenosa en este estudio fue del 100 % en el grupo control, considerando que éste fue masculinizado accidentalmente. También se evaluó su efecto en cuanto al desarrollo de las

gónadas y los porcentajes de esterilidad. Los resultados de los tratamientos probados en este trabajo mostraron masculinización de 33.3 % y esterilidad de hasta 93.3 %, resultados que se mantuvieron hasta el final de las evaluaciones mensuales, en coincidencia con lo reportado por otros autores como Yamazaki (1976), el cual mencionó que la administración oral de la 17MT durante 5 meses, inhibe el desarrollo de la gónada en la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*. De manera similar, Goetz *et al.* (1979), también reportaron la presencia de esterilidad administrando la 17MT a individuos de *Oncorhynchus kisutch*.

En términos generales, las mediciones de peso y longitud en las evaluaciones mensuales fueron menores con respecto al grupo control. Lo anterior difiere significativamente con lo encontrado por Ali y Rao (1989), ya que, ellos observaron que un año después del tratamiento hormonal, los peces tratados mostraron una supervivencia más alta (95 %) y un mejor crecimiento (252 g) que en el grupo control (85 % supervivencia y 230 g en peso). Varios autores han reportado resultados similares para otras especies tratadas con la 17MT (Baker *et al.*, 1978). Tal es el caso de Davis y Ludwig (2004), quienes estudiaron el efecto hormonal sobre la diferenciación sexual y el crecimiento de *Morone chrysops* y *Morone saxatilis*, y observaron que aunque en los machos el desarrollo testicular se vio afectado no lo fue para su crecimiento el cual se vio favorecido por el tratamiento con la 17 MT.

Por otro lado, nuestros resultados coinciden en primera instancia con el estudio de Johnstone *et al.* (1978), debido a que durante su análisis experimental encontraron un crecimiento menor en truchas tratadas con estrógeno en comparación a su grupo control. El peso promedio del grupo control fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que el experimental, 245.07 ± 178.23 vs. 187.03 ± 138.82 g $\pm$ DE, respectivamente. También mencionaron que los pesos fueron diferentes a lo largo del cultivo. Sin embargo, cinco meses después del tratamiento hormonal no se encontraron diferencias significativas entre el peso de éstas y el control, el cual se vio igualado. En el caso de nuestros resultados, esas diferencias se mantuvieron hasta el final de la última evaluación al tercer mes, lo que pudiera

estar relacionado con las condiciones bajo las cuales se han realizado cada una de las investigaciones. Bastardo y Sara-Sofía (2003), sugieren que los distintos resultados entre laboratorios y criaderos pueden ser consecuencia de la relación densidad/tasa de crecimiento, diferencias en el fotoperíodo y el tiempo de estudio.

Lo anterior no es completamente comparable debido a las diferencias entre los esteroides utilizados en cada trabajo, además de la naturaleza de la especie con la que existe una diferencia taxonómica con respecto a la cabrilla, no obstante, puede ser una justificación. Otra razón, puede deberse a lo mencionado por Pandian y Sheela (1995) quienes señalaron que cuando existe un tratamiento hormonal de larga duración y que produjo la esterilidad de la especie tratada, esto puede conducir a una atrofia en el crecimiento. De acuerdo a lo anterior, los resultados obtenidos se apegan más a esta afirmación, coincidiendo con lo reportado por Blázquez *et al.* (1995), que para juveniles de *Dicentrarchus labrax* tratados con la 17MT por más de 100 días, presentaron una supresión considerable en el crecimiento, lo cual viene a reforzar lo propuesto por Pandian y Sheela (1995).

8.5 Reducción en el tamaño de la gónada e inhibición de su desarrollo

Otra de las observaciones que se pudieron realizar en la evaluación del tercer mes, fueron las diferencias del tamaño de las gónadas de los individuos tratados y los del grupo control, encontrándose para los primeros, gónadas de tamaño menor en algunos casos y en su mayoría la ausencia de la misma. Blázquez *et al.* (1995), observaron que el tratamiento con la 17MT tuvo un efecto sobre el desarrollo de las gónadas donde se presentó una significativa reducción del tamaño, haciéndose más evidente conforme aumentaba el tiempo de tratamiento. En el estudio realizado por Sathyanarayana-Rao y Satyanarayana-Rao (1983) con administración de la 17MT y la 17 β -estradiol en *Cyprinus carpio*, mostraron un retardo significativo en el desarrollo y tamaño de la gónada en ambos sexos.

Aunque se desconoce la dosis, sin duda el efecto de la 17MT sobre el crecimiento y desarrollo de las gónadas de los juveniles de la cabrilla fue positivo para el grupo control, masculinizado accidentalmente, presentándose 100 % machos de tamaño mayor al resto de los tratamientos, con gónadas bien desarrolladas y viables.

Al no conocer las dosis y los tiempos adecuados para un tratamiento con la 17MT sobre juveniles de la cabrilla, se corría el riesgo de ocasionar feminización como resultado final de una masculinización revertida por sobredosis de hormona, ya que se ha reportado en investigaciones sobre otras especies, cuando altas dosis son suministradas, en algunos ejemplares se presenta feminización paradójica y a su vez se atenta con la supervivencia de la población (Omoto *et al.*, 2002). En el trabajo realizado por Fenske y Segner (2004) con el pez zebra, el tratamiento con la 17MT fue aplicado al medio acuático donde observaron que a concentraciones menores a 10 g/l de agua, el tratamiento inducía a la masculinización mientras que a concentraciones más altas de 10 g/l de agua es convertida a estradiol generándose así una feminización paradójica.

8.6 Ventajas de la esterilización

Precisamente la justificación de este trabajo radica en poder optimizar el cultivo de la cabrilla arenera y sin duda el haber logrado masculinizar y esterilizar a un alto porcentaje de la población tratada, es un avance importante. Los peces estériles tienen utilidad para aumentar la eficiencia de producción de carne al reducir el gasto de energía en el proceso de maduración sexual, incrementando el crecimiento, evitándose el deterioro en la calidad de la carne y cambios en la coloración de la piel. Con la utilización de peces estériles se puede además retrasar las cosechas, lográndose peces de mayor peso y edad. También se evita la aparición de machos precoces entre los peces destinados a cosecha (Díaz y Neira, 2005).

Se estima que la concentración que provocó la masculinización del grupo control se encuentra en niveles menores a los manejados en los tratamientos, por lo

que esto significa plantear nuevos esquemas de estudio, para poder determinar dichas concentraciones, ya que fue efectiva para lograr un incremento en talla significativo respecto a los dos tratamientos, lo cuales también fueron exitosos para masculinizar pero su efecto fue seguido por un proceso de esterilización.

Estos hallazgos, sugieren la posibilidad de inducir a la esterilización mediante la administración oral de la 17MT o en su defecto como promotor de masculinización. Pero es importante poder estandarizar la dosis y/o la duración de tratamiento específicamente para la cabrilla arenosa para poder superar las contrariedades presentadas en este ensayo con respecto a la atrofia en el crecimiento provocada por sobredosis hormonal. Incluso poder determinar la menor concentración que permita esterilizar pero con los beneficios de talla que se obtuvieron en la masculinización incidental.

Otros autores sugieren tener un grupo control simultáneamente en otro sistema de crianza, para evitar los efectos de contaminación por 17MT y ocasionar masculinización incidental (Budworth y Senger, 1993). Sin embargo, se debe considerar que se presentarían otros factores, al tener dos sistemas de crianza independientes uno del otro, la mínima diferencia entre ellos puede traer consigo efectos sobre el crecimiento, la supervivencia, la mortalidad, etc. Es una alternativa que debe ser considerada y analizada para próximos esquemas de estudio.

8.7 Análisis de residualidad de la 17MT mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. HPLC

La técnica cromatográfica empleada en este estudio para la detección de la 17MT en el alimento y agua del sistema de crianza de juveniles de cabrilla (HPLC) es uno de los procedimientos más importantes del laboratorio moderno, como una herramienta analítica utilizada para separar y detectar compuestos químicos con gran sensibilidad. La cromatografía de líquidos de alta resolución tiene aplicabilidad sobre la detección de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, antibióticos, esteroides, entre otros. Además, ha sido empleada

recientemente para la detección de la 17MT en estudios de inversión sexual con *Cyprinus carpio* (Hulak, *et.al*, 2008). De esta manera, este ejercicio cromatográfico nos permitió constatar la presencia del andrógeno sintético 17MT en el alimento tratado.

De igual forma, los análisis del agua del sistema de crianza fueron indispensables, para determinar la presencia o ausencia de la 17MT, ya que diariamente los juveniles eran alimentados. Estudios realizados por Johnstone *et al.* (1983) con las especies *Oreochromis mossambicus* y *Oncorhynchus mykiss* mostraron que más del 99 % de la hormona administrada a través del alimento es liberada en el agua en menos de 24 horas. La detección del compuesto hormonal fue fundamental como parte inicial de este estudio, donde fue posible determinar su eliminación diaria en el agua del sistema de crianza, ya que no excedieron el límite mínimo de detección (0.1 µg).

Pandian y Sheela (1995), coinciden con Johnstone *et al.* (1983), ya que también afirman que el 99 % de la hormona administrada a través del alimento es metabolizada y eliminada del organismo en menos de 24 horas de haberse consumido, lo anterior, depende de la especie tratada, ya que en otros grupos se ha observado que esa eliminación se puede llevar a cabo en unos pocos días más. No obstante, los análisis realizados a las muestras de agua nos permitieron corroborar la ausencia de hormona en el sistema, al menos en la forma química del compuesto original.

9. CONCLUSIONES

Conforme a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir los siguientes aspectos:

- A los 30 días después de la eclosión y con 1.15 cm de longitud patrón aparecen las primeras células germinales primordiales, tiempo mínimo necesario para iniciar con éxito un tratamiento con la 17MT sobre los juveniles de cabrilla arenera.
- Las dosis empleadas en este trabajo fueron mayores a las requeridas por la especie, ya que, en el tratamiento de 30 mg/Kg de 17MT, la menor dosis probada, se presentaron procesos de esterilización en el primer tiempo de evaluación.
- El grupo control fue masculinizado accidentalmente por compuestos originados por la desnaturalización de la 17MT circulantes en el sistema de crianza.
- El primer tiempo de evaluación (30 días con 17MT), empleado para este estudio, se considera como el tiempo efectivo para la obtención de resultados a corto plazo.
- El análisis histológico aplicado a los juveniles de cabrilla, fueron útiles para la observación de estructuras, identificación de los tipos celulares y la interpretación de los estadios de maduración sexual en el que se encontraban los individuos de cabrilla.

10. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO

Para seguir con la misión de cubrir todos los aspectos de la biología reproductiva de la cabrilla arenera, se hacen las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones, que permitan tener más y nuevos conocimientos acerca de la especie:

- Realizar un muestreo a largo plazo que permita evaluar el estado de la gónada de los peces tratados y así determinar la permanencia del tratamiento hormonal.
- Es importante plantear nuevos esquemas de estudio que permitan determinar los compuestos originados después de que la 17MT es metabolizada, conocer cuales son los metabolitos formados y sus concentraciones en el medio.
- Implementar una estrategia que permita tener el seguimiento de un grupo control sin influencia del tratamiento hormonal.
- Además del HPLC para la detección de la 17MT, es posible utilizar otra técnica que es el radioinmunoanálisis (RIA) consiste en una técnica de laboratorio de análisis clínico y ha propiciado un gran avance de la endocrinología. Es una técnica sensible, mide pequeñas cantidades de los componentes en cuestión como la cantidad de hormonas que hay en el organismo, entre ellas, estrógenos, testosterona y otras hormonas sexuales.
- Se recomienda emplear un solo fijador durante el estudio, de preferencia aquellos que tengan como componente ácido acético, como el fijador Davison. Este ácido es ideal para la fijación de ácidos nucleicos (ADN, evidenciado por la técnica de Feulgen) además de facilitar la descalcificación y evitar el endurecimiento del músculo.

- Aunque los análisis histológicos facilitaron y permitieron la identificación de células y estadios de maduración se recomienda utilizar pruebas inmunohistoquímicas que puedan proporcionar más elementos al momento de determinar la presencia de células germinales primordiales.
- Posterior a la preparación del alimento, se recomienda implementar una medida para homogenizar automáticamente y no de forma manual a las partículas de alimento con la solución hormonal. Lo anterior, con la finalidad de conseguir una uniformidad en el tamaño de partícula e impregnación y asegurarse la misma ingesta para el cultivo.
- En futuras pruebas con objetivos de masculinización, se recomienda utilizar concentraciones de la 17MT menores a 30 mg/Kg de alimento en un intervalo de 30 días.

11. LITERATURA CITADA

- Abucay, J.S. y 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. y R.P. Phelps. 1997. Sex reversal in black crappie *Pomoxis nigromaculatus*: Effect of oral administration of 17 α -metilttestosterone on two age classes. **Aquaculture**, 158: 155-165.
- Ali, P.K.M.M. y G.P.S. Rao. 1989. Growth improvement in carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus), sterilized with 17 α -methyltestosterone. **Aquaculture**, 76: 157-167.
- Álvarez-González, C.A., R. Civera-Cerecedo, J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, M. Moreno-Legorreta y T. Grayeb-Del Alamo. 2001. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. **Aquaculture**, 194: 151-159.
- Avilés-Quevedo, A., U. McGregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Hiraes-Cosio, M.A. Huerta-Bello y M. Lizawa. 1995. **Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868)**. Subsecretaría de Pesca. Instituto Nacional de la Pesca, México. 82 pp.
- Baker, I.J., I.I. Solar y E.M. Donaldson, 1988. Masculinization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17 α -methyltestosterone around the time of hatching. **Aquaculture**, 72: 359-367.
- Balinsky, B.I. 1978. **Introducción a la Embriología**. Ediciones Omega. Barcelona, España. 664 pp.
- Ball, J. y B. Baker. 1969. The Pituitary gland: anatomy and histophysiology. **Fish Physiology**, 2: 1-110 pp.
- Balon, K. 2002. Patterns in the evolution of reproductive styles in fishes. Fish reproduction: Strategies and Tactics. Academic Press. London. 347pp.
- Bastardo, H.R. y B. Sara, B. Sofia. 2003. Masculinización de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, para obtener descendencia todas hembras en un criadero venezolano. **Zootecnia Trop**, 21 (1): 27-41.
- Beardmore, J.A., G.C. Mair y R.I. Lewis. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, 197: 283-301.
- Begtashi, I., L. Rodríguez, G. Moles, S. Zanuy y M. Carrillo. 2004. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea

- bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. **Aquaculture**, 241: 539-559.
- Blázquez, M., F. Piferrer, S. Zanuy, M. Carrillo y 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 (4): 329-342.
- Budworth, P.R. y P.L. Senger. 1993. Fish-to-fish testosterone transfer in a recirculating-water system. **Progressive Fish-Culturist**, 55: 250-254.
- Chatain, B., E. Saillant y S. Peruzzi. 1999. Production of monosex male populations of European seabass, *Dicentrarchus labrax* L. by use of the synthetic androgen 17 α -metiltestosterone. **Aquaculture**, 178: 225-234.
- (Anónimo) CONAPESCA-SAGARPA. 2004. **Anuario estadístico de pesca 2002**. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México.
http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/planeacion/boletin/INDICADOR_DICIEMBRE.xls
- (Anónimo) CONAPESCA-SAGARPA. 2007. **Anuario estadístico de pesca** (México en línea). Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México.
<http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/planeacion/planea.htm>
- Davis, K.B. y G. M. Ludwig. 2004. Hormonal effects on sex differentiation and growth in sunshine bass *Morone chrysops* - *Morone saxatilis*. **Aquaculture**, 231: 587–596.
- Demska-Sakes, K. y Z. Sakes. 1997. Effect of 17 α -metiltestosterone on gonadal differentiation in pikeperch, *Stizostedion lucioperca* (L.). **Aquaculture**, 28: 59-63.
- Devlin, R.H. y Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. **Aquaculture**, 208: 191–364.
- Díaz N.F. y R. Neira. 2005. Biotecnología Aplicada a la Acuicultura I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. **Cien. Inv. Agr.**, 32 (1): 45-59.
- Estrada-Flores, E. y M. del C. Uribe-Aranzábal. 2002. **Atlas de histología de vertebrados**. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. 222 pp.
- Fenske, M. Segner, H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, 67: 105–126.

- Gale, W.L., M.S. Fitzpatrick, M.L. Wilfrido, M. Contreras-Sánchez y C.B. Schreck. 1999. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. **Aquaculture**, 178: 349–357.
- Gomelsky, B., N.B. Cherfas, Y. Peretz, N. Ben-Dom y G. Hulata. 1994. Hormonal sex inversion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, 126: 265-270.
- Gray, P. 1954. **The Microtome's Formulary and Guide**. Robert E. Krieger Publishing Co. 234 pp.
- Hoar, W. y D. Randall. 1969. The endocrine system. **Fish Physiology**. Academic Press. Nueva York. Vol.2.
- Hulak, M., M. Paroulek, P. Simek, M. Kocour, D. Gela, M. Rodina y O. Linhart. 2008. Water polluted by 17 α -metilttestosterone provides successful male sex inversion of common carp (*Cyprinus carpio* L.) from gynogenetic offspring. **Appl. Ichthyol.**, 1-4
- Humason, G. L. 1962. **Animal Tissue techniques**. W.H. Freeman and Co., Fourth edition. San Francisco, Ca. U.S.A. 692 pp.
- Hunter, G.A., y E.M. Donaldson. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), **Fish Physiology, Reproduction, Behaviour, and Fertility Control**, Vol. IX-B. Academic Press, New York, pp, 223-303.
- Johnstone, R., T.H. Simpson y A.F. Youngson. 1978. Sex reversal in salmonid culture. **Aquaculture**, 13: 115-134.
- Kirankumar, S. y T.J. Pandian. 2002. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, 293 (6): 606-616.
- Kohler Ch.C. 1997. Target animal safety and dosage efficacy studies for walleye fed 17 α Methyltestosterone. **National Aquaculture**, plan of work for grant. 45pp.
- Lloyd, C.W. 1963. **Advances in neuroendocrinology**. University of Illinois, Press. 245 pp
- Lluch-Cota, D.B. 1995. Aspectos reproductivos de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces:Serranidae) en Bahía Magdalena-Almejas, Baja California Sur, México. **Tesis Maestría en Ciencias**, CICIMAR-IPN. 174p.

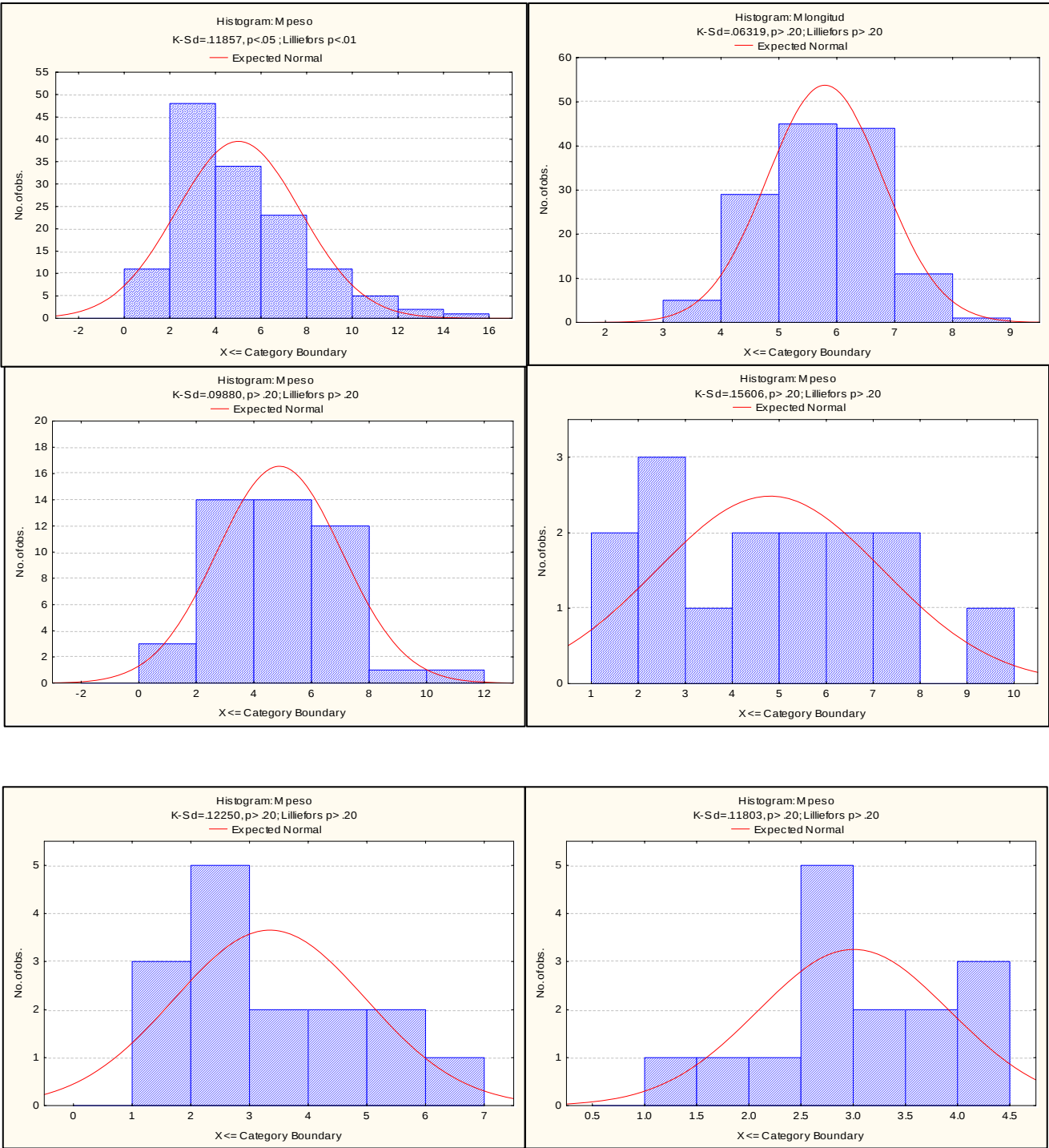
- Malison J.A., T.B. Kayes, C.D. Best y C.H. Amundson. 1986. Sexual differentiation and use of hormones to control sex in yellow perch (*Perca flavescens*). **Canadian J. Fish. Aquat. Sci.**, 43: 26-35.
- Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, R. Martínez-Pecero y J.L. Ortiz-Galindo. 1990. Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano con base a su biología temprana. Pp 68-74. En: G. De la Lanza-Espino y J.L. Arredondo-Figueroa (eds) **La Acuicultura en México: de los conceptos a la producción**. UNAM. México.
- McMaster, M. 1994. **HPLC: A Practical User's Guide**. Wiley-VCH. 345 pp.
- Nagahama, Y., M. Yoshikuni, M. Yamashita, T. Tokumto y Y. Katsu. 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. **Current Topics on Developmental Biology**, 30: 103-145.
- Nelson, J.S. 2006. **Fishes of the World**. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 3rd ed. 600 pp.
- 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.
- Omoto, N., M. Maebayashi, E. Mitsuhashi, K. Yoshitomi, S. Adachi y K. Yamauchi. 2002. Effects of estradiol-17b and 17a-methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. **Fisheries Science**, 68: 1047–1054.
- Ortiz-Galindo, J.L. 1991. Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* (Gunther, 1864). **Tesis de Maestría**. CICIMAR-IPN. México. 58 pp.
- Pandian, T.J. y S.G. Sheela. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, 138: 1-22.
- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, 197: 229–281.
- Piferrer, F y E.M. Donaldson. 1989. Gonadal differentiation in Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, 77: 251-262.
- Popma, T.J. y B.W. Grenn. 1990. Sex reversal of Tilapia in Earthen Ponds. Acuacultural Production. **Internacional Center for Aquaculture**, serie no. 35.
- Reartes, J. 1995. El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): métodos de cría y cultivo masivo. **COPESCAL, Doc. Ocasional**, 9: 1-35.

- 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.
- Rosales-Velázquez, M.O., J.L. Ortiz-Galindo, M. Contreras-Olguín y G. García-Melgar. 1999. Evidencia de hermafroditismo protogínico en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* mantenida en cautiverio. **Oceanología** **23**.
- Rougeot, C., B. Jacobs, P. Kestemont y Ch. 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.
- Ruiz-Durá, M.F. 1988. **Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción**. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. 374 pp.
- Sadovy, Y y Y.D. 1987. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. **Copeia** 1987 (1): 136-156.
- Sánchez-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 p.
- Santos, R.S.; S.J. Hawkinis & R.D. Nash. 1996. Reproductive phenology of the Azorean rock pool blenny a fish alternative mating tactics. **J. Fish Biol.**, 48: 842-858.
- Sathyanarayana-Rao, H.N. y G.P. Satyanarayana-Rao. 1983. Hormonal manipulation of sex in the common carp, *Cyprinus carpio* var. *communis* (Linnaeus). **Aquaculture**, 35: 83-88.
- Shapiro, Y.D. 1987. Reproduction in groupers. Pp. 295-327. *En* J.J. Polovina and S. Ralston, Eds. **Tropical snappers and groupers, biology and fisheries management**. West view Press, Boulder and London.
- Shapiro, Y.D. 1989. Sex change as an alternative life-history style. *En*: Bruton, M.N. (Ed). **Alternative life-history styles of animals**. Kluwer Acad. Publish. (Netherlands): 177-195.
- Solar, I.I., E.M. Donaldson y G.A. Hunter. 1984. Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and esterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17 α -metiltestosterone. **Aquaculture**, 42: 129-139.
- Snyder, L.I.R. y J.J. Kirkland. 1979. **Introduction to modern liquid chromatography**. Ed. J. Wiley, 2da edición. New York. 863 pp.

- Snyder, LI R., J.L. Glajch y J.J. Kirkland. 1988. Practical HPLC method development. Ed. J. Wiley. New York. 260 pp.
- Thresher, R.E. 1984. Reproduction in reef fishes. T.F.H. Publications Neptune City. U.S.A.
- Tucker, J.W. 1998. **Marine Fish Culture**. Kluwer Academia Publisher. Massachussets, U.S.A. 750 pp.
- Villee, C. 1995. **Biología**. Séptima edición. Ed. Mc. Graw-Hill. Interamericana, México. 875 pp
- Yamamoto, T.O. 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). **J. Exp. Zool.**, 123 (3): 571-594.
- Yamamoto, T.O. 1969. Sex differentiation. Pp. 117-175 In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), **Fish Physiology**, Vol. III. Academic Press, New York.
- Yamazaki, F. 1976. Application of hormones in fish culture. **J. Fish. Res. Board Can.**, 33: 948-958.
- Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, 33: 329-354.

ANEXO A)

Pruebas de Normalidad



ANEXO B)

Prueba de Tukey

Tukey HSD test; variable M peso (Concentrado de datos sandunguita)

Approximate Probabilities for Post Hoc Tests

Error: Between MS = 5.8388, df = 126.00

M tratamiento	M categoría	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
		3.1200	3.5500	4.7838	3.3720	4.4342	4.8789	6.0671
30	2		0.999914	0.715732	0.999998	0.931930	0.670615	0.074288
30	3	0.999914		0.885208	1.000000	0.987813	0.851564	0.137197
30	4	0.715732	0.885208		0.888662	0.999537	0.999999	0.245367
60	2	0.999998	1.000000	0.888662		0.982367	0.859316	0.213112
60	3	0.931930	0.987813	0.999537	0.982367		0.998360	0.364551
60	4	0.670615	0.851564	0.999999	0.859316	0.998360		0.387414
C	3	0.074288	0.137197	0.245367	0.213112	0.364551	0.387414	

Tukey HSD test; variable M peso (Concentrado de datos mensuales)

Approximate Probabilities for Post Hoc Tests

Error: Between MS = 5.8388, df = 126.00

	M tratamiento	{1}	{2}	{3}
Cell. No.		4.3700	4.5929	6.0671
1	30		0.899873	0.002497
2	60	0.899873		0.010630
3	C	0.002497	0.010630	

ANEXO C)

Tabla de datos de significancia

Univariate Tests of Significance for M peso (Concentrado de datos sandunguita)

Sigma-restricted parameterization

Effective hypothesis decomposition

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	20677.25	1	20677.25	333.1547	0.000000
M mes	22864.24	3	7621.41	122.7972	0.000000
M tratamiento	167.24	2	83.62	1.3473	0.262010
M mes*M trat:	137.90	6	22.98	0.3703	0.897330
Error	14088.76	227	62.07		

ANEXO D)

Análisis de Friedman

$$X_r^2 = \left[\frac{12}{ba(a+1)/12} \sum R_i^2 \right] - 3b(a+1)$$

El valor crítico dado por las tablas de distribución de Friedman es 5.99

					a=3 b=3		
Mes 01	Control	30 mg	60 mg		12/(a*b)	Sumatorias^	3b(a+b)
N		0	0	0	0.33333333	109.5	36
1 hembra		0	0	0			
2 indiferencia		1	3	2	36.5		
3 macho		3	1.5	1.5		0.5	P>0.05
4 esterilidad x		1	2	3			
5 macho esté		0	0	0			
		5	6.5	6.5			

Mes 02	Control	30 mg	60 mg		12/(a*b)	Sumatorias^	3b(a+b)
N		0	0	0	0.33333333	110	36
1 hembra		0	0	0			
2 indiferencia		1	2	3	36.6666667		
3 macho		3	1	2		0.66666667	P>0.05
4 esterilidad x		1	3	2			
5 macho esté		0	0	0			
		5	6	7			

Mes 03	Control	30 mg	60 mg		12/(a*b)	Sumatorias^	3b(a+b)
N		0	0	0	0.33333333	108.5	36
1 hembra		0	0	0			
2 indiferencia		1.5	3	1.5	36.1666667		
3 macho		3	1	2		0.16666667	P>0.05
4 esterilidad x		1	2	3			
5 macho esté		0	0	0			
		5.5	6	6.5			

Mes 10	Control	30 mg	60 mg		12/(a*b)	Sumatorias^	3b(a+b)
N		31	37	47	0.25	201.5	48
1 hembra		0	0	0			
2 indiferencia		1	2	3	50.375		
3 macho		3	1	2		2.375	P>0.05
4 esterilidad x		1	2.5	2.5			
5 macho esté		1.5	1.5	3			
		6.5	7	10.5			

ANEXO E)

Prueba de Chi-cuadrada

MES 01

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
Control	0	15	0	15
30 mg	2	5	8	15
60 mg	1	5	9	15
total	3	25	17	45

Frec esp 1	1
Frec esp 2	8.33333333
Frec esp 3	5.66666667

Cálculo de Xi cuadrada

1	g.l	4
1	intervalo conf	0.95
0		
5.33333333	valor crítico	9.488
1.33333333		
1.33333333	existe dif. Significativa	
5.66666667	p <0.05	
0.96078431		
1.96078431		
xi cuadrada	18.5882353	

NOTA: Entre 30 y 60 mg no existe diferencia significativa

tratamiento	Control	30 mg	60 mg
Indiferenciados	0	2	1
Machos	15	5	5
Estériles	0	8	9

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
30 mg	2	5	8	15
60 mg	1	5	9	15
total	3	10	17	30

Frec esp 1	1.5
Frec esp 2	5
Frec esp 3	8.5

Cálculo de Xi cuadrada

0.16666667	g.l	2
0.16666667	intervalo conf	0.95
0		
0	valor crítico	5.991
	No hay diferencia significativa entre 30 y 60mg	
0.02941176		
0.02941176		
xi cuadrada	0.39215686	

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
Control		0	15	0
30 mg		2	5	8
total	2	20	8	30

Frec esp 1 1
Frec esp 2 10
Frec esp 3 4

Cálculo de Xi cuadrada

1 g.l 2
1 intervalo conf 0.95

2.5 valor crítico 5.991
2.5

4 existe dif. Significativa entre el control y 30mg
4 p <0.05

xi cuadrada 15

MES 02

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
Control	0	15	0	15
30 mg	2	2	11	15
60 mg	4	6	5	15
total	6	23	16	45

Frec esp 1	2
Frec esp 2	7.66666667
Frec esp 3	5.33333333

Cálculo de Xi cuadrada

2	g.l	4
0	intervalo conf	0.95
2		
7.01449275	valor crítico	9.488
4.1884058		
0.36231884	existe dif. Significativa	
5.33333333	p <0.05	
6.02083333		
0.02083333		
sumatoria		26.9402174

tratamiento	Control	30 mg	60 mg
Indiferenciados	0	2	4
Machos	15	2	6
Estériles	0	11	5

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
Control	0	15	0	15
30 mg	2	2	11	15
total	2	17	11	30

Frec esp 1	1
Frec esp 2	8.5
Frec esp 3	5.5

Cálculo de Xi cuadrada

1	g.l	2
1	intervalo conf	0.95
4.97058824	valor crítico	5.991
4.97058824		
5.5	existe dif. Significativa entre el control y 30 mg	
5.5	p <0.05	
sumatoria		22.9411765

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
30 mg		2	2	11
60 mg		4	6	5
total		6	8	16

Frec esp 1 3
Frec esp 2 4
Frec esp 3 8

Cálculo de Xi cuadrada

	0.33333333	g.l	2
	0.33333333	intervalo conf	0.95
	1	valor crítico	5.991
	1		
	1.125		
	1.125		
sumatoria	4.91666667	No hay diferencia significativa entre 30 y 60mg	

MES 03

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
Control	0	15	0	15
30 mg	2	0	13	15
60 mg	0	1	14	15
total	2	16	27	45

Frec esp 1 0.66666667
 Frec esp 2 5.33333333
 Frec esp 3 9

Cálculo de Xi cuadrada

0.66666667	g.l	4
2.66666667	intervalo conf	0.95
0.66666667		
17.5208333	valor crítico	9.488
5.33333333		
3.52083333	existe dif. Significativa	
9	p <0.05	
1.77777778		
2.77777778		
sumatoria		43.9305556

tratamiento	Control	30 mg	60 mg
Indiferenciados	0	2	0
Machos	15	0	1
Estériles	0	13	14

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
Control	0	15	0	15
30 mg	2	0	13	15
total	2	15	13	30

Frec esp 1 1
 Frec esp 2 7.5
 Frec esp 3 6.5

Cálculo de Xi cuadrada

1	g.l	2
1	intervalo conf	0.95
7.5	valor crítico	5.991
7.5		
	existe dif. Significativa entre el control y 30 mg	
6.5	p <0.05	
6.5		
sumatoria		30

tratamiento	cat 2	cat 3	cat 4	total
30 mg		2	0	13
60 mg		0	1	14
total		2	1	27

Frec esp 1 1
 Frec esp 2 0.5
 Frec esp 3 13.5

Cálculo de Xi cuadrada

g.l 2
 intervalo conf 0.95
 valor crítico 5.991

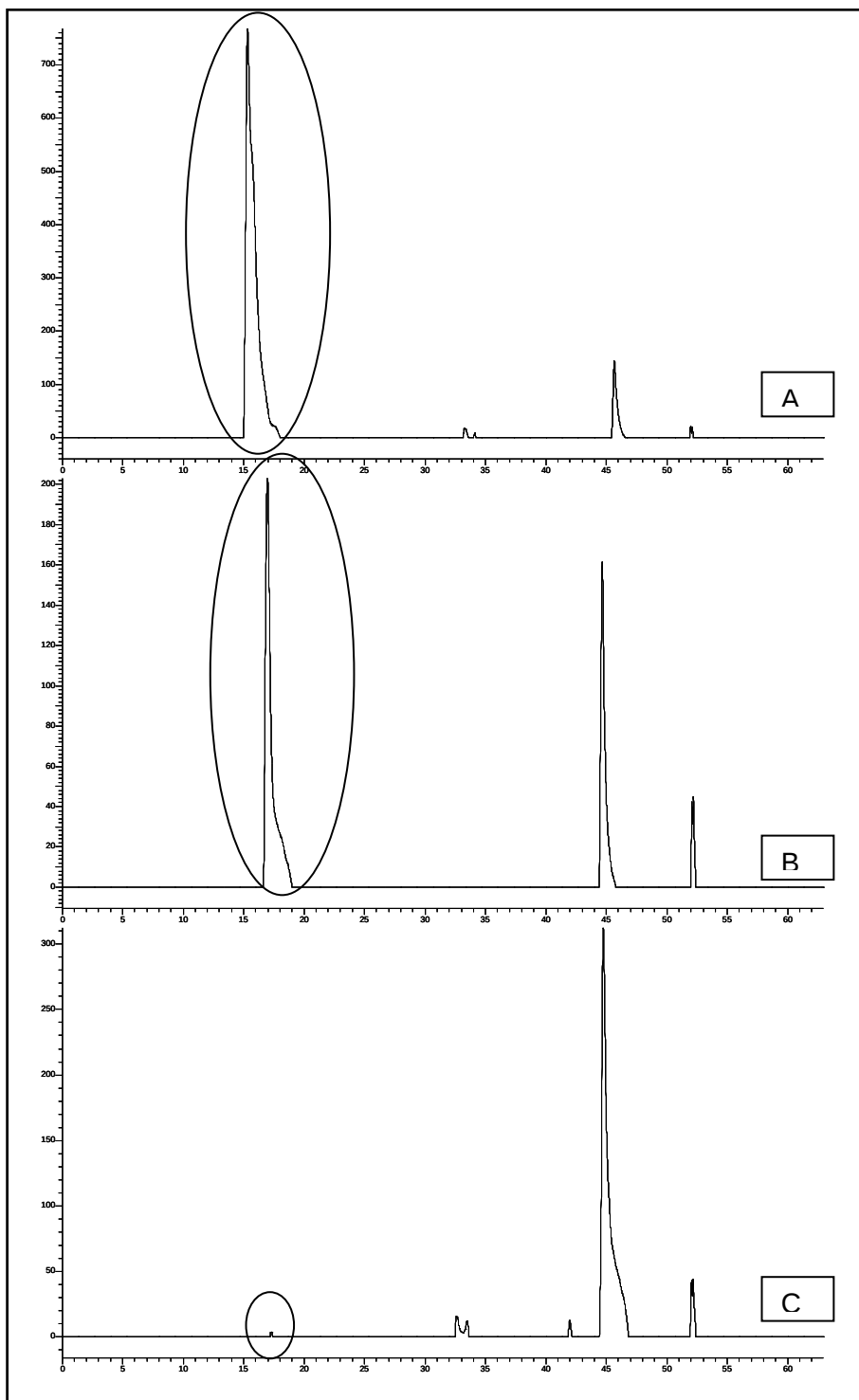
No hay diferencia significativa entre 30 y 60mg

sumatoria $\frac{0.01851852 + 0.01851852}{3.03703704}$

ANEXO F)

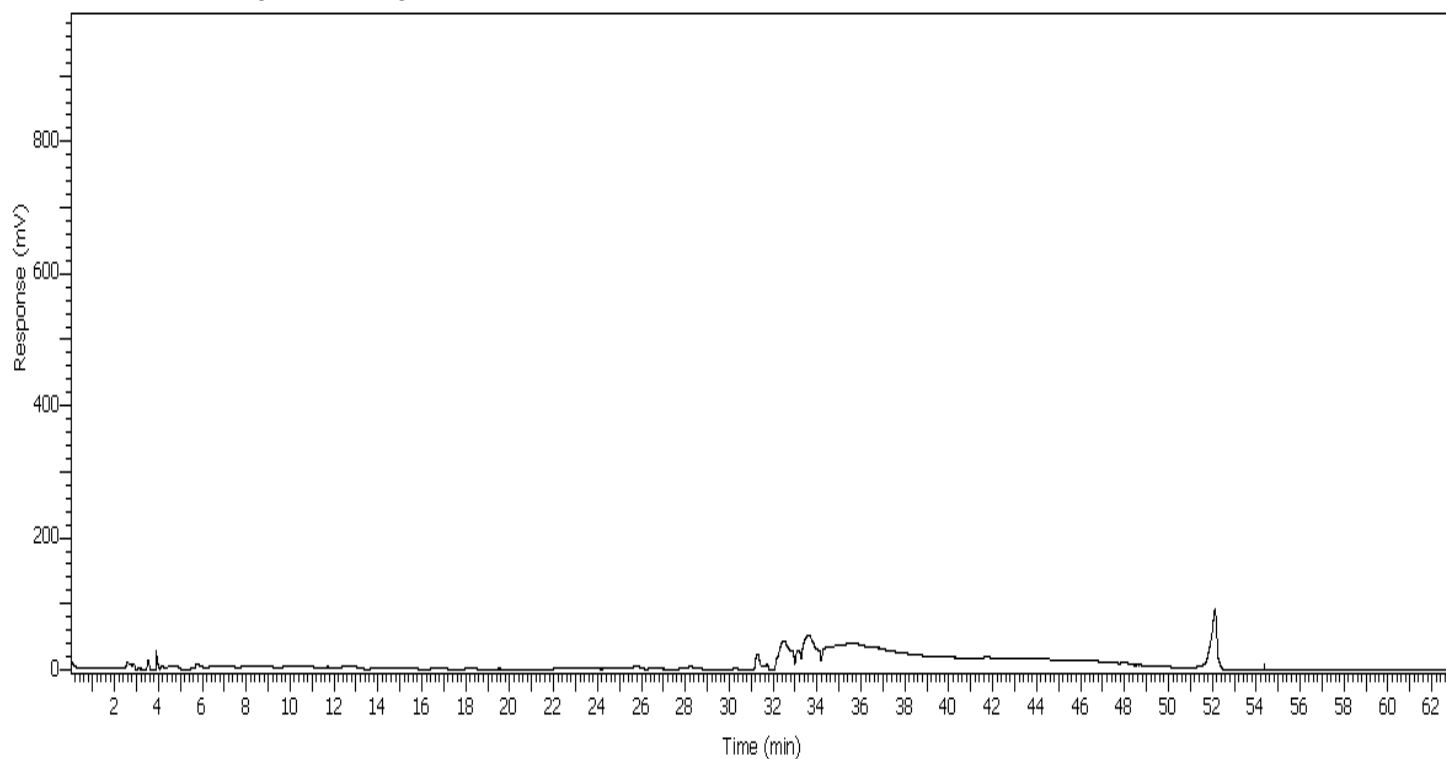
Determinación del límite de detección de la 17MT

Referencia cromatográfica de la 17MT a A) 5 μg (1/50), B) 1 μg (1/100) y C) 0.1 μg (1/1000).
Pico alrededor de los 17 minutos decrece cuantitativamente con la concentración de la 17MT.

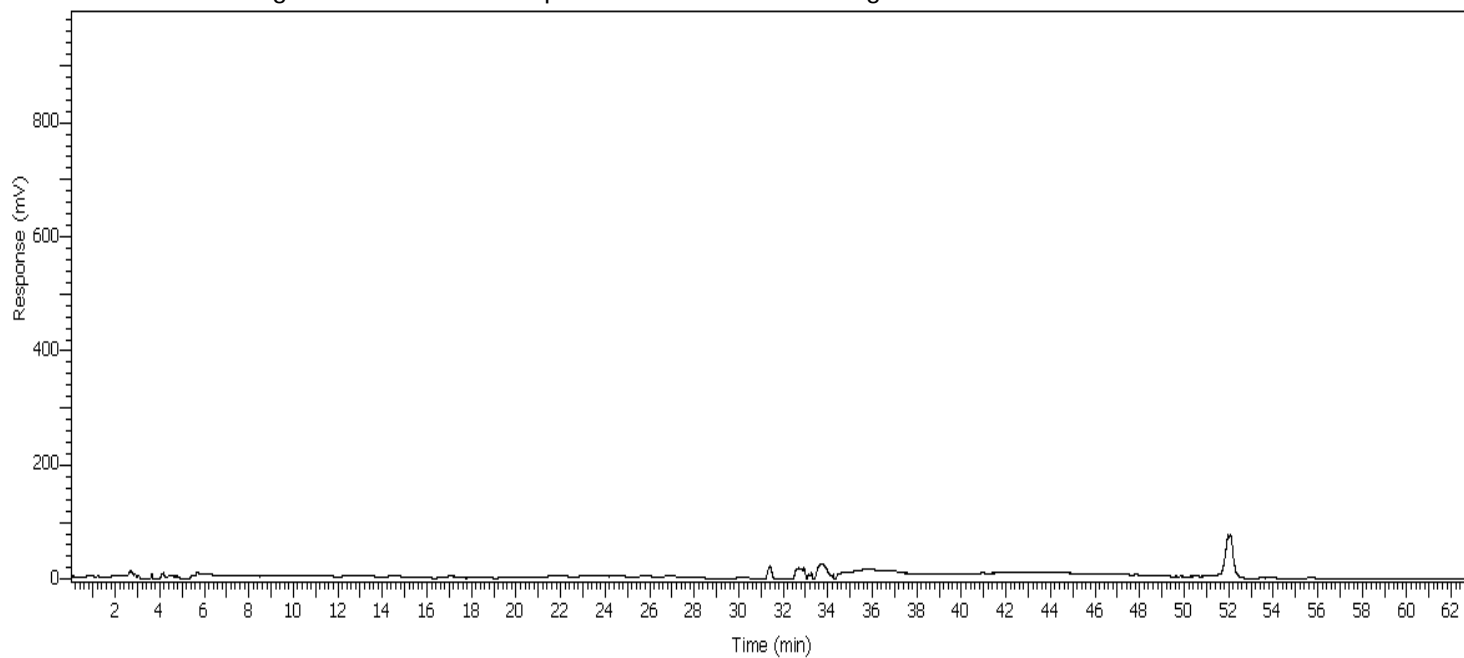


Análisis de las muestras de agua

Cromatograma del agua de la cisterna

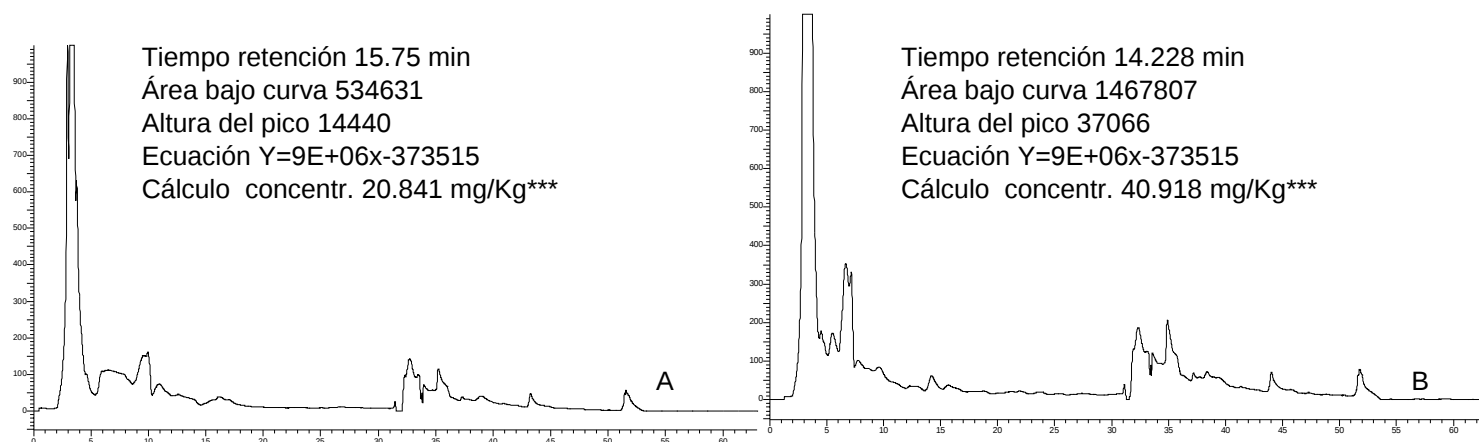


Cromatograma del sifón en tanque con tratamiento de 60mg



* Nótese que en ninguno de los dos casos se proyecta el pico a los 17 minutos característico de la presencia de 17 MT

Datos obtenidos de la referencia cromatográfica del HPLC en el recuadro de cada cromatograma.



A) Alimento con 30 mg de la 17MT recuperado en un 66.4% de la muestra.

B) Alimento con 60 mg de la 17MT recuperado en un 66.4% de la muestra

***El trazo de la línea base muestra un área que no se cuantifica, por lo que el 33.6% restante es subestimado por el método.