



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Loma Bonita

INGENIERÍA EN ACUICULTURA

TESIS

**FEMINIZACIÓN DE LA TILAPIA DEL NILO
(*Oreochromis niloticus* L.) MEDIANTE ESTRADIOL-17 β .
EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO, DESARROLLO
GONADAL Y COMPOSICIÓN CORPORAL.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ACUICULTURA

PRESENTA

PAOLA RUEDA CURIEL

DIRECTOR

DR. JUAN PABLO ALCÁNTAR VÁZQUEZ

CO-DIRECTORA

M. EN C. CAROLINA ANTONIO ESTRADA



Universidad del Papaloapan

Terra Uberrima. Mens Aperta

CLAVE: 20ESU3001N

Ingeniería en Acuicultura

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

LA PRESENTE TESIS TITULADA "FEMINIZACIÓN DE LA TILAPIA DEL NILO (*Oreochromis niloticus* L.) MEDIANTE ESTRADIOL-17 β . EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO, DESARROLLO GONADAL Y COMPOSICIÓN CORPORAL", PRESENTADA POR LA PASANTE PAOLA RUEDA CURIEL, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JUAN PABLO ALCÁNTAR VÁZQUEZ Y LA CO-DIRECCIÓN DE LA M.C. CAROLINA ANTONIO ESTRADA, HA SIDO REVISADA Y ACEPTADA POR EL JURADO EXAMINADOR PARA SER DEFENDIDA EN EL EXAMEN PROFESIONAL Y OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN INGENIERÍA EN ACUICULTURA.

JURADO EXAMINADOR

DR. JUAN PABLO ALCÁNTAR VÁZQUEZ
DIRECTOR

M. C. CAROLINA ANTONIO ESTRADA
CO-DIRECTORA

M. C. NICOLÁS VALENZUELA
JIMÉNEZ
REVISOR

DR. JOSÉ ÁNGEL RUEDA
BARRIENTOS
REVISOR

M. C. RAÚL MORENO
DE LA TORRE
REVISOR

LOMA BONITA, OAXACA, OCTUBRE DE 2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi director, el **Dr. Juan Pablo Alcántar Vázquez** y co-directora la **M. en C. Carolina Antonio Estrada** por su trabajo, compromiso, apoyo y guía para culminar esta tesis.

Sé que la revisión de una tesis no es fácil, por lo que agradezco a los revisores de esta tesis **M. en C. Raúl Moreno de la Torre, M. en C. Nicolás Valenzuela Jiménez y el Dr. José Angel Rueda Barrientos** por su tiempo, consejos y aportaciones a este trabajo.

También agradezco a mi casa de estudios, la **Universidad del Papaloapan** por su excelente calidad educativa brindada durante mis años como estudiante. En especial a sus **Profesores** porque cada uno de ellos aportó un poco a lo que soy profesionalmente ahora.

Un especial agradecimiento a mi familia, **Ángel Rueda Canseco, María del Carmen Curiel Galicia y Teresita de Jesús Rueda Curiel** por su apoyo incondicional, su trabajo, su tiempo y sus sacrificios en pro del logro de mis metas y sueños.

Gracias **Prisma Y.** por sus cuidados y apoyo en cada momento desde que nos conocemos en la universidad.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico especialmente a mi bebé, que me llegó a dar el impulso más grande y desinteresado que he recibido en mi vida.

RESUMEN

La feminización de alevines indiferenciados de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) como primera etapa en la producción de machos YY es crucial, sin embargo, aún no es 100 % confiable y los porcentajes de hembras XY obtenidos son variables. Debido a lo anterior, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de dos concentraciones (60 mg Kg⁻¹ y 120 mg Kg⁻¹) de estradiol-17β (E₂), suplementadas en la dieta a intervalos de una hora durante 30 días, en la proporción de sexos, el crecimiento, el desarrollo gonadal y la composición corporal de la tilapia del Nilo. El proceso de hormonado se llevó a cabo en un sistema de recirculación compuesto por 12 acuarios de 85 L de capacidad y el crecimiento posterior en tanques de ferrocemento de 3 m de diámetro. La proporción de hembras fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los grupos tratados con E₂, especialmente en los alimentados con la dosis de 120 mg Kg⁻¹. Se detectaron peces con papila genital atípica y ovarios normales en ambas concentraciones de E₂. Estos peces se consideraron hembras revertidas. El crecimiento fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en los machos, en comparación con las hembras normales y las hembras revertidas en todos los grupos analizados. No se observó tejido testicular en ninguno de los ovarios de las hembras revertidas analizadas. El porcentaje de lípidos en músculo aumentó, mientras que el de proteína disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en las hembras revertidas, en comparación con lo observado en el grupo control. El efecto de la concentración de E₂ en la producción de hembras revertidas fue claramente dependiente de la concentración. Las hembras revertidas se cruzarán con machos normales, para obtener machos YY, con el objetivo de producir poblaciones compuestas al 100 % de machos genéticos.

Palabras clave: Feminización, Machos YY, Estradiol-17β, Tilapia del Nilo.

ABSTRACT

The feminization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) undifferentiated fry as first stag in YY male production is crucial, however, still not 100% reliable and percentages of XY females obtained are variables. Because of the above, the objective of this work was evaluated the effect of two concentrations (60 mg Kg⁻¹ y 120 mg Kg⁻¹) of estradiol-17 β (E₂), supplemented on diet at 1 h-intervals over a period of 30 days, on sex ratio, growth, histology and body composition of Nile tilapia. The hormonal treatment was carried out in a closed recirculating system conform by 12 aquariums of 85 L each, growth post treatment was carried out in 3 m diameter concrete tanks. Female ratio was significantly greater ($P < 0.05$) in groups treated with E₂, especially in those fed with 120 mg Kg⁻¹ doses. Fish with genital atypical papilla and normal ovaries was detected in both E₂ concentrations. These fish were classified as sex-reversed females. Males growth was significantly greater ($P < 0.05$) than normal females and sex-reversed females in each group tested. There was not testicular tissue in any sex-reversed female ovaries tested. Lipid concentration in muscle increase, while protein concentration decreased significantly ($P < 0.05$) in sex-reversed female, compared with control group. The effect of E₂ concentration on production of sex-reversed female was clearly dose-dependent. Finally, sex-reversed females will be crossed with normal males, to obtain YY males, in order to produce 100% genetic male population.

Keywords: Feminization, YY Male, Estradiol-17 β , Nile tilapia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE CUADROS	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Producción de tilapia del Nilo	5
2.2 Tilapia del Nilo	6
2.3 Técnicas para la obtención de cultivos monosexo	8
2.4 Determinación del sexo	8
2.5 Proceso de reversión sexual	10
2.6 Machos YY	11
2.7 Estrategias de feminización	12
2.8 Variables en el proceso de feminización	13
2.9 Estradiol-17 β (E ₂)	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos particulares	17
4. HIPÓTESIS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Localización del experimento	19
5.2 Clima	19
5.3 Tratamiento y diseño experimental	19
5.4 Desarrollo del experimento	20
5.4.1 Reproductores	20
5.4.2 Preparación del alimento hormonado	20
5.4.3 Producción de alevines en condiciones experimentales	20
5.4.4 Crecimiento de juveniles en estanques de concreto con recirculación	21
5.4.5 Evaluación de la proporción de sexos e identificación de hembras revertidas	22
5.5 Desarrollo gonadal	22
5.6 Composición corporal	22
5.7 Análisis estadístico	23
6. RESULTADOS	24
6.1 Periodo de alevín	24
6.2 Supervivencia final y proporción de sexos	24
6.3 Crecimiento post-tratamiento hormonal	25
6.4 Desarrollo gonadal	26
6.5 Composición corporal	29
7. DISCUSIÓN	31
8. CONCLUSIONES	38
9. RECOMENDACIONES	39
10. LITERATURA CITADA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de tilapia en el 2013.	7
Figura 2. Producción acuícola por especie durante el 2013 en México.	7
Figura 3. Serie histórica de la producción acuícola de tilapia en México.	8
Figura 4. Proceso de producción de machos YY.	12
Figura 5. Crecimiento a los cinco meses de edad de tilapia del Nilo tratada con estradiol-17 β a diferentes concentraciones por 30 días. (A) Peso húmedo y (B) Longitud estándar.	27
Figura 6. Sección transversal de las gónadas (a) Testículo del grupo control y (b) Testículo de organismo tratado con E ₂ (c) Ovario de hembras del grupo control y (d) Ovario de hembras tratadas con E ₂ (e) Ovario de hembra revertida y (f) Ovario de hembras revertidas.	28
Figura 7. Composición corporal del músculo (% de peso seco) (A) lípidos y (B) proteína cruda.	30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos disponibles para la producción de cultivos monosexo de machos con ventajas y desventajas.	9
Cuadro 2. Ventajas y desventajas del uso de hormonas para la reversión sexual en peces.	11
Cuadro 3. Hormonas sintéticas y naturales usadas para feminizar teleósteos.	15
Cuadro 4. Resumen de tratamiento y diseño experimental.	19
Cuadro 5. Supervivencia y longitud estándar durante el periodo de alevín de la tilapia del Nilo tratada con estradiol-17 β a diferentes dosis.	24
Cuadro 6. Supervivencia y la distribución de sexos de la tilapia del Nilo tratada con estradiol-17 β a diferentes dosis durante 30 días.	25

1. INTRODUCCIÓN

Desde los tiempos prehistóricos, dos necesidades primarias de la humanidad persisten; alimentación y abrigo, las formas de cubrir estas necesidades han ido cambiando y así la sociedad evolucionó de la caza y la recolección a la agricultura. En la actualidad la explosión demográfica ha generado un incremento en la demanda de alimentos por lo que se han sobreexplotado los recursos naturales finitos y han tenido que surgir nuevas actividades productoras de alimento, tal es el caso de la acuicultura, termino relativamente nuevo que se refiere al cultivo de plantas y animales acuáticos (FAO, 2014).

La acuicultura en el 2012 aportó casi la mitad (49 %) de la producción pesquera (136 millones de toneladas) destinada al consumo humano y la demanda de este producto ha aumentado constantemente (3.2 % anual) durante los últimos años. Los peces de escama fueron los más producidos (49.8 millones de toneladas) principalmente en aguas continentales, debido a que es relativamente fácil cultivar en ellas, los países en desarrollo aportaron 57.9 % de la producción de peces comestibles. Esta elevada producción hace que la acuicultura en aguas continentales juegue un rol importante en la seguridad alimentaria mundial (FAO, 2014).

Desde el 2012, la tilapia se ha mantenido como el segundo grupo de mayor producción y el más expandido a nivel mundial. El éxito de la tilapia se atribuye a dos factores (Suresh & Bhujel, 2012):

- a) Sus cualidades como alimento: carne blanca, sabor neutral y textura firme.

- b) Su facilidad de cultivo: se adaptan fácilmente al cautiverio, son menos susceptibles a enfermedades comparadas con otras especies y pueden crecer en una amplia variedad de sistemas de cultivo.

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es dentro del grupo de las tilapias la más importante para la acuicultura, y la de mayor producción en México, debido a su rápido crecimiento, tolerancia a un amplio rango de temperatura y salinidad. Además de su viabilidad para cultivo tropical y en aguas salobres. Sin embargo, alcanzar la uniformidad de talla al momento de la cosecha es complicado debido a su temprana reproducción, pues dirigen una gran cantidad de energía a las actividades reproductivas afectando negativamente la cantidad de energía disponible para el crecimiento (Tran *et al.*, 2011).

Los machos de la tilapia del Nilo crecen más rápido que las hembras, por lo que los cultivos monosexo se presentan como una opción conveniente para resolver el problema de maduración precoz. Las técnicas utilizadas para lograr cultivos monosexo son variadas: el sexado manual, la reversión sexual con hormonas y el uso de machos YY son las técnicas más utilizadas a nivel comercial para controlar la reproducción precoz. El uso de hormonas exógenas ha sido el mecanismo más empleado para la reversión sexual. En la tilapia del Nilo se ha utilizado 17α -metiltestosterona como andrógeno, incorporando la hormona a la dieta de los alevines en una concentración de 40-60 ppm y alimentándolas durante 21 días desde su primera comida, obteniendo poblaciones compuestas de 99 a 100 % de machos (Jiménez & Arredondo, 2000; Daza *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2010). De las principales desventajas del uso de hormonas es la percepción negativa de la población, ya que existe difusión de información negativa sobre el consumo de hormonas en los alimentos, por lo que ha surgido un rechazo al consumo de cualquier producto que las

contenga (Müller & Hörstgen, 2007). Adicionalmente, la acumulación de hormonas en los cuerpos continentales de agua y en el mar es otro factor negativo del uso de hormonas a nivel comercial (Lee *et al.*, 2011).

La producción de machos YY, elimina la necesidad de utilizar hormonas para producir poblaciones monosexo, aunque el método requiere del uso de hormonas en la primera etapa del desarrollo de los reproductores YY para feminizar alevines XY (Beardmore *et al.*, 2001).

La técnica de producción de machos YY consiste en producir reproductores genotipo YY, llamados frecuentemente supermachos. La idea detrás de esta técnica es que estos machos YY al cruzarse con hembras normales (XX) arrojen poblaciones compuestas por un 100 % de machos genéticos. Sin embargo, aunque la técnica no requiere el uso de hormonas para producir poblaciones monosexo en los especímenes que son comercializados, la primera parte de la técnica requiere la feminización de lotes de alevines con genotipo XY a través de hormonas exógenas, ya sean naturales o sintéticas (Alcántar-Vázquez *et al.*, 2014). La feminización de alevines no diferenciados es la primera etapa de la producción de machos YY y es crucial, ya que es la base para obtener hembras XY para después cruzarlas con machos normales y obtener una porción de machos YY.

La producción de machos YY es un método laborioso que consume tiempo por la extensa prueba de progenie involucrada. Sin embargo, una vez que el stock reproductivo ha sido obtenido, puede ser utilizado en cualquier sistema reemplazando machos normales por machos YY. A diferencia de la masculinización que es una técnica bien conocida, la

feminización aún no se domina, por lo que los porcentajes de hembras XY obtenidos son variables (Alcántar-Vázquez *et al.*, 2014).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Producción de tilapia del Nilo

El grupo conocido como “tilapias” abarca un grupo de peces dulceacuícolas que posee características que las han convertido en uno de los grupos de peces cultivados más exitosos en la actualidad, ubicándolo en el segundo lugar en cuanto a volumen producido a nivel mundial (FAO, 2014).

En la Figura 1 se muestra la producción mundial de tilapia por especie en el 2013, las especies del genero *Oreochromis* son las de mayor producción a nivel mundial, siendo la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) la de mayor producción (99.21 %), seguida de la tilapia Mozambique (*O. mossambicus*) con 0.71 % y otras especies como la tilapia azul (*O. aureus*), tilapia rendali (*Tilapia rendalli*) y tilapia zillii (*Tilapia zillii*) (0.08 %) (FishStatJ, 2016).

En México la tilapia del Nilo es la segunda especie con mayor producción en la acuicultura y su producción ha aumentado considerablemente durante los últimos años (Figura 2 y 3). En el 2013, los estados de Jalisco (20.51 %), Chiapas (16.12 %) y Veracruz (11.25 %) fueron los mayores productores a nivel nacional (CONAPESCA, 2013).

La región del Papaloapan produce 13,022 t de tilapia al año, de las cuales 11,482.68 t corresponden al estado de Veracruz y 1540 t al estado de Oaxaca. Así, la producción en dicha región representa el 12.76 % del total en el país. Lo anterior, hace evidente la importancia de esta región en la producción de tilapia, por lo que es necesario impulsar el consumo de dicha especie en el mercado local, principalmente en lugares donde se puede

producir, con la finalidad de aprovechar los beneficios nutritivos que aporta este pez (CONAPESCA, 2013).

2.2 Tilapia del Nilo

Tilapia es el nombre común aplicado a tres géneros y más de 70 especies de la familia *Cichlidae*: *Oreochromis*, *Sarotherodon* y *Tilapia*. Las tilapias están dentro de las especies de aguas cálidas más importantes para la acuicultura. La tilapia del Nilo constituye el 99.21 % de la producción mundial de tilapia. Las evaluaciones de las características de la tilapia en diferentes regiones concluyeron que la tilapia del Nilo muestra el mejor desempeño reproductivo, crecimiento y supervivencia (Macaranas *et al.*, 1997). La principal razón de su éxito es que tiene rápido crecimiento en aguas tropicales, son fáciles de reproducir en cautiverio, en el trópico pueden reproducirse durante todo el año y la producción de alevines puede hacerse en un amplio rango de ambientes. La hembra muestra cuidado parental, la fecundidad es relativamente baja y los huevos son grandes. Los alevines comienzan a comer tan pronto es absorbido el saco vitelino y aceptan fácilmente comida viva o seca. Alcanzan la madurez sexual a los 2-3 meses y pueden reproducirse cada 3-4 semanas. Alcanzar la madurez sexual provoca una descontrolada sobrepoblación incrementando la demanda de comida y recursos, lo que resulta en una falta de homogeneidad de talla y se elevan los costos de producción. Los machos de la tilapia crecen más rápido que las hembras, por lo que en el cultivo comercial se elige producir poblaciones compuestas a un 100 % por machos, también llamados cultivo monosexo (Cnaani & Hulata, 2008).

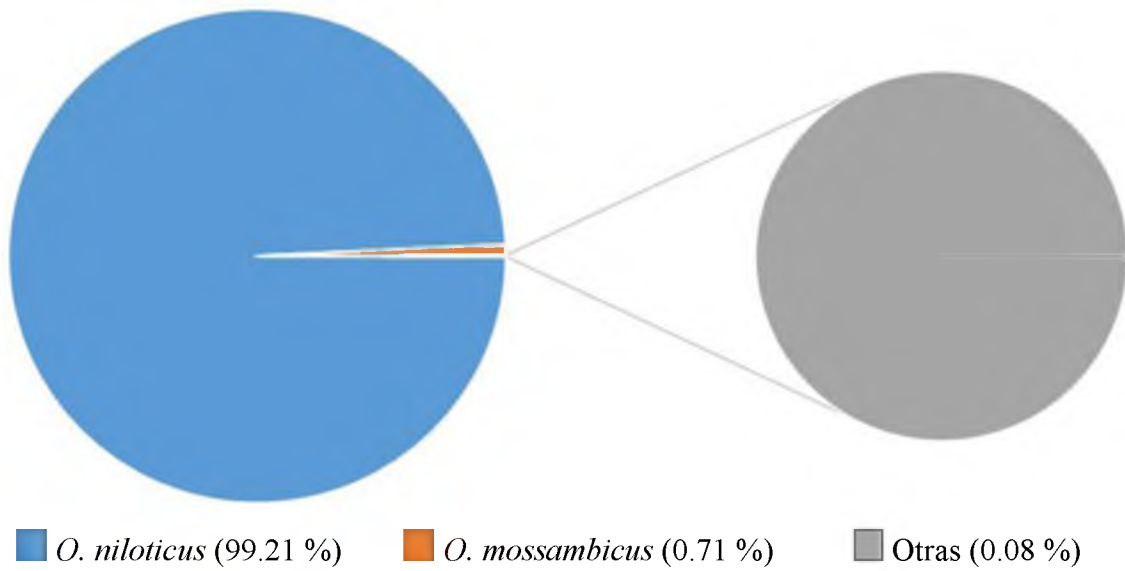


Figura 1. Producción mundial de tilapia en el 2013 (FishStatJ, 2016).

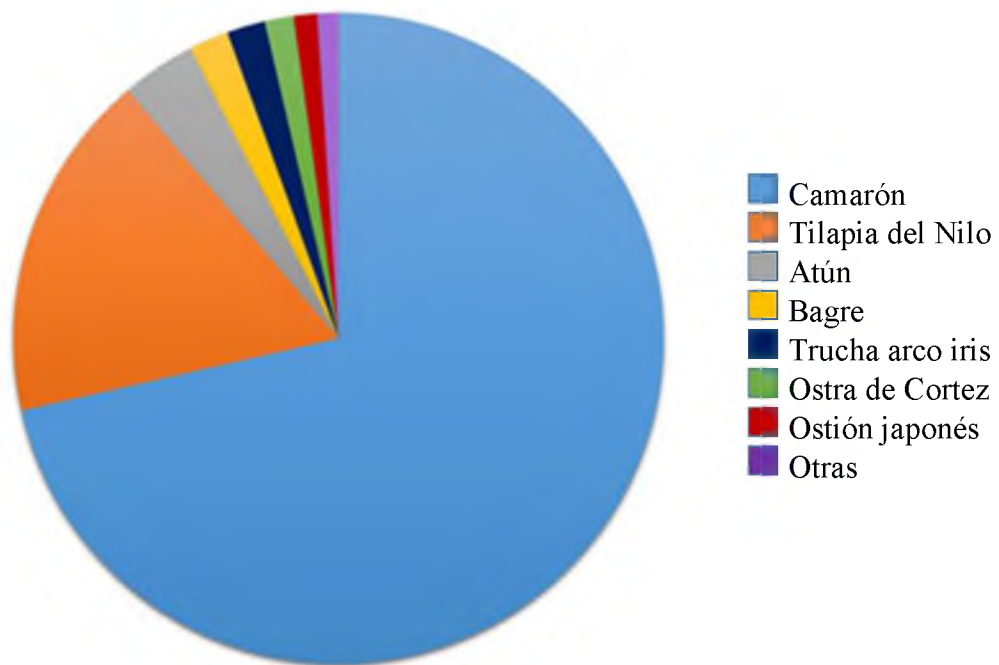


Figura 2. Producción acuícola por especie durante el 2013 en México (CONAPESCA, 2013).

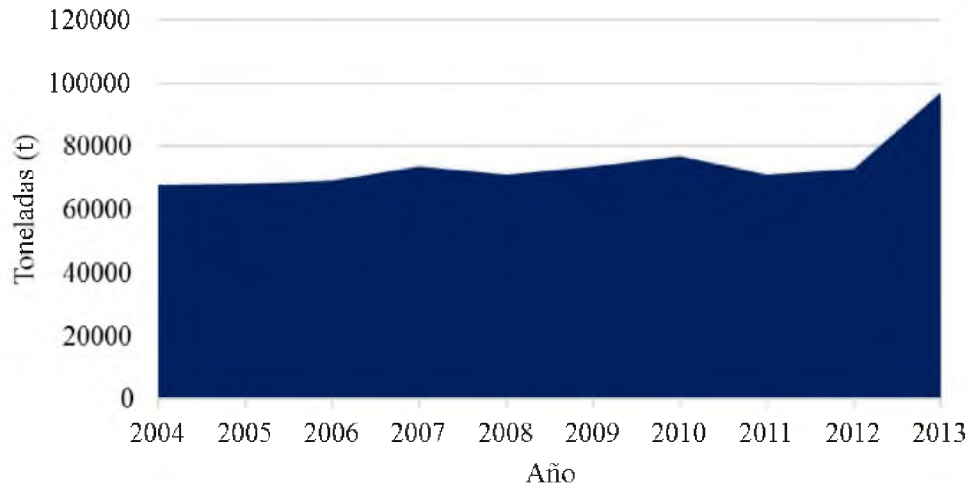


Figura 3. Serie histórica de la producción acuícola de tilapia en México (CONAPESCA, 2013).

2.3 Técnicas para la obtención de cultivos monosexo

Varias son las técnicas utilizadas para controlar la maduración sexual precoz en la tilapia; sin embargo, no todas son 100 % efectivas o fáciles de aplicar a gran escala. En el Cuadro 1 se resumen las técnicas de producción de poblaciones monosexo que existen con sus ventajas y desventajas.

2.4 Determinación del sexo

Similar a lo que se ha visto en varios estudios en teleósteos, los análisis clásicos de cariotipo no muestran alguna diferencia dimorfa entre los machos y hembras de tilapia del Nilo (Majumar & McAndrew, 1986; Bezault *et al.*, 2001). En la determinación del sexo influyen factores ambientales y hormonales; sin embargo, la determinación genética es primeramente a través de cromosomas sexuales o regiones cromosómicas como en el caso de la tilapia del Nilo. Baroiller *et al.* (2009) mencionan que la determinación del sexo en la tilapia del Nilo está relacionada a la interacción de tres componentes: un complejo

sistema genético de determinación sexual con un locus principal como factor determinante (cromosoma sexual XX/XY) y factores genéticos menores (factores parentales), así como la influencia de factores ambientales como la temperatura. La temperatura afecta la determinación del sexo, exponer alevines de la tilapia del Nilo a bajas temperaturas (20 a 21 °C) o altas temperaturas (34 a 38 °C) resulta en una feminización o masculinización de las gónadas, respectivamente (Wang & Tsai, 2000; Dunham, 2012).

Los esteroides son quizá el factor más importante en la determinación del sexo. Aparentemente hay una edad (10-15 días después de eclosionar) en el desarrollo de la tilapia donde la determinación del sexo está influenciada por el nivel de andrógeno y estrógeno circulando en el cuerpo (Suresh & Bhujel, 2012).

Cuadro 1. Métodos disponibles para la producción de cultivos monosexo de machos con ventajas y desventajas.

Método	Uso comercial	Ventajas	Desventajas
Sexado manual	Raro	Fácil	Costos en tiempo y es estresante para los organismos.
Hormonado	Sí	Alto porcentaje de machos (99 %)	Caro, residuos hormonales. Necesita protección el trabajador. Requiere altos niveles de control. Mala percepción pública.
Hibridación interespecífica		Fácil	Posible impacto en el ambiente por los escapes de reproductores.
Androgénesis Triploides	No	Especies homogaméticas	Dificultad para aplicar a escala comercial.
Transgénesis	Raro	Alta consistencia	Puede ser difícil para el mercado por la mala percepción pública.
Machos YY	Sí	Especies heterogaméticas. Factible y consistente. Amigable con el ambiente.	Se requiere vigilancia en la selección y el manejo de los reproductores.

Fuente: Beardmore *et al.*, 2001

2.5 Proceso de reversión sexual

Las poblaciones monosexo pueden ser obtenidas a través de la reversión sexual hormonal. La reversión sexual ha sido utilizada como una herramienta valiosa en la investigación del mecanismo de determinación del sexo. En el Cuadro 2 se presentan las ventajas y desventajas del uso de hormonas para la reversión sexual en acuicultura.

Las técnicas de reversión sexual han sido revisadas por varios autores (Hunter & Donaldson, 1983; Yamazaki, 1983; Pandian & Sheela, 1995; Jiménez & Arredondo, 2000; Daza *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2010). En los protocolos de reversión sexual se estima que se ha experimentado con más de 31 diferentes esteroides para más de 50 especies. La masculinización y feminización hormonal puede lograrse de dos formas: directa o indirecta. La feminización directa se refiere a la aplicación de andrógenos o estrógenos en alevines no diferenciados, cuyo objetivo es lograr la reversión sexual en la misma generación en que fue aplicada la hormona. Por otro lado, en la feminización indirecta la reversión sexual hormonal se aplicará a una primera generación (F1) y después de una serie de pruebas de progenie el resultado se ve reflejado en la F3 (Piferrer, 2001).

De los 16 andrógenos naturales y sintéticos que existen para obtener poblaciones monosexo de machos el más común es la 17 α -metiltestosterona que ha sido probada en más de 25 especies de las familias, *Salmonidae*, *Cichlidae*, *Cyprinidae*, *Anabantida*, *Poecilidae* y *Cyprinodontidae*, entre otros. El modo común de administración es por vía oral, mezclando el andrógeno, previamente disuelto en alcohol, con el alimento. La técnica de inmersión también ha sido aplicada con éxito. La tilapia del Nilo es la única especie en que la reversión sexual con hormonas es rutinariamente usada en producciones comerciales de poblaciones monosexo de machos (Beardmore *et al.*, 2001).

Cuadro 2. Ventajas y desventajas del uso de hormonas para la reversión sexual en peces.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none">• Asegura la maximización del crecimiento dirigiendo todos los nutrientes al crecimiento y no al desarrollo gonadal, asegurando mejor calidad del músculo.• Elimina la madurez precoz.• La técnica en sí combinada con una técnica de poliploidia proporciona las bases para crear reproductores para poblaciones 100 % de machos, hembras o estériles.	<ul style="list-style-type: none">• Se debe utilizar la técnica cada que se quiera producir poblaciones monosexo.• Aumenta los costos en tiempo y dinero.• Los residuos de los esteroides pueden ser cancerígenos.• El proceso puede ser estresante.• Puede afectar la madurez sexual y por consecuencia la producción de huevos o esperma.• Altas dosis pueden causar esterilidad.• Percepción negativa de la población.

Fuente: Pandian & Sheela, 1995

2.6 Machos YY

El programa más exitoso de reversión sexual desde el punto de vista económico en la tilapia del Nilo ha sido la producción de poblaciones 100 % machos XY a partir de machos YY. Este sistema ha demostrado en tilapia del Nilo que puede incrementar hasta en un 50 % la producción (Beardmore *et al.*, 2001). Los machos YY genotípicos de la tilapia del Nilo son viables y fértiles igual que los machos normales XY. La tecnología de machos YY provee una solución al problema de maduración sexual precoz, reproducción no deseada y sobrepoblación en cultivos de tilapia del Nilo (Beardmore *et al.*, 2001; Dunham, 2004).

La producción de machos YY elimina la necesidad de utilizar hormonas para producir semilla. Aunque el método requiere del uso de hormonas para feminizar en la primera etapa del desarrollo de los reproductores YY. Es un método laborioso que consume tiempo por la extensa prueba de progenie involucrada, sin embargo, una vez que el stock

reproductivo ha sido establecido puede ser utilizado en cualquier sistema reemplazando machos normales por machos YY. En la Figura 4 se presenta el proceso que involucra la producción de machos YY.

Etapas	Grupo inicial	Proceso	Resultado
1	Alevines no diferenciados	Feminización	<i>Hembras XY</i>
2	<i>Hembras XY</i>	Prueba de progenie	Identificación
3	<i>Hembras XY</i>	x machos normales (XY)	Hembras XX Machos XY <i>Machos YY</i>
4	<i>Machos YY</i>	Prueba de progenie	Identificación
5	<i>Machos YY</i>	x hembras normales (XX)	Población monosexo de machos XY

Figura 4. Proceso de producción de machos YY (Mair *et al.*, 1997).

2.7 Estrategias de feminización

Hay dos métodos de feminización de peces: la terapia hormonal y la inducción de ginogénesis. A su vez, la terapia hormonal se puede dividir en directa e indirecta. La feminización directa puede ser aplicada a cualquier especie, e involucra el uso de estrógenos a temprana edad. Usualmente se utiliza un estrógeno natural o sintético y se aplica a una generación objetivo (Piferrer, 2001).

La feminización indirecta es para especies en el cual la hembra es homogamética. Esta involucra la masculinización de hembras genotípicas (XX) de un stock de peces mixtos (XX y XY). La masculinización no es el objetivo principal, pero si un paso esencial;

requiere más de una generación y una vez que se logra un stock 100 % hembras es relativamente fácil mantenerla. Su aplicación comercial más conocida es en el salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Donaldson, 1986; Solar *et al.*, 1987) y trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Bye & Lincoln, 1986).

Otro uso importante del estrógeno es la producción de machos YY, esta técnica ha sido exitosa en varias especies incluyendo el pez dorado (*Carassius auratus*) (Yamamoto, 1969), la trucha arcoíris (Johnstone *et al.*, 1979; Chevassus *et al.*, 1988), la tilapia del Nilo (Scott *et al.*, 1989), la tilapia de Mozambique (Varadaraj & Pandian, 1989) y el pez guppy (*Poecilia reticulata*) (Kavumpurath & Pandian, 1993).

También se puede feminizar por ginogénesis, que es un tipo especial de partenogénesis donde un huevo es estimulado por espermatozoides genéticamente inactivos para dividirse. Entonces, el desarrollo embrionario es inducido sin contribución genética del esperma, para inactivar el esperma, usualmente se utiliza radiación UV, también se pueden utilizar espermias de otras especies. Debido a la significativa baja viabilidad de peces ginogénicos, las hembras obtenidas no son viables para la producción directa, además usualmente exhiben ovarios anormales (Piferrer & Donaldson, 1994), por lo que no parece ser una opción muy viable para la producción a gran escala.

2.8 Variables en el proceso de feminización

Las variables que se deben contemplar durante el proceso de feminización son el tipo de estrógeno, la dosis del tratamiento, el periodo de tratamiento y la etapa de desarrollo en la que se aplicará el tratamiento.

Los estrógenos pueden ser naturales o sintéticos. Existen 12 diferentes estrógenos para peces, 3 naturales y 9 sintéticos (Cuadro 3); que se utilizan para la feminización de teleósteos, de los estrógenos naturales el más efectivo es el estradiol-17 β (E₂), ya que se le considera el más importante en la determinación del sexo de forma natural (Piferrer, 2001). Se ha comprobado que la feminización fenotípica es inducida exitosamente usando estradiol-17 β (Yamazaki & Watanabe, 1989; Yamazaki, 1983). Particularmente en el caso de la tilapia del Nilo existe escasa información del efecto de estradiol-17 β exógeno en alevines no diferenciados de esta especie.

El estrógeno sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) y dietilestilbestrol (DES) se consideran los feminizantes más potentes. El EE₂ es más potente que el DES en la tilapia del Nilo (Gilling *et al.*, 1996) y tres veces más potente que el E₂. Además, es más potente feminizando que la metiltestosterona masculinizando (Piferrer & Donaldson, 1994).

La etapa del tratamiento es otra variable a considerar. Existe un periodo durante el desarrollo llamado el periodo lábil, que se define como el periodo de tiempo donde las gónadas no están sexualmente diferenciadas y responden más a la acción de esteroides exógenos. El tratamiento hormonal durante el periodo lábil requiere la combinación adecuada entre dosis y duración del tratamiento. Parece existir una relación inversa entre la duración del tratamiento y la dosis necesaria para la reversión sexual. El objetivo al momento de diseñar un tratamiento debe ser minimizar la dosis y duración del tratamiento (Piferrer, 2001). El tiempo que dure el tratamiento se determina con base en el estrógeno a utilizar, la dosis y la especie con la que se trabaja, y puede durar desde unas pocas horas hasta años. El momento crítico para iniciar el tratamiento hormonal de la tilapia del Nilo originalmente se ha establecido desde que el alevín alcanza un tamaño de 10-12 mm y

hasta los 14-15 mm durante 28 días de tratamiento para asegurar una elevada eficiencia de reversión (Shelton *et al.*, 1978; Vera-Cruz *et al.*, 1996).

Cuadro 3. Hormonas sintéticas y naturales usadas para feminizar teleósteos.

Estrógenos naturales	Estrógenos sintéticos
Estrona (E ₁)	Dietilestilbestrol (DES)
Estradiol-17β (E ₂)	Dietilestilbestrol difosfato (DES-DP)
Estriol (E ₃)	Dietilestilbestrol dipropionato (Euvestin)
	Dihidrodietilestilbestrol (Hexestrol)
	17α-etinilestradiol (EE ₂)
	14, 15-metilestradiol (ME ₂)
	Benzoato de estradiol (EB)
	Butiril acetato estradiol (EBA)
	Propionato de estradiol (EP)

Fuente: Piferrer, 2001

2.9 Estradiol-17β (E₂)

El E₂ se encuentra en niveles muy altos en hembras y machos, y se cree que es el esteroide sexual responsable de inducir y mantener el desarrollo del ovario (Yamamoto, 1969). Es uno de los estrógenos más importantes en peces, se produce en los ovarios y en otros tejidos como el cerebro.

Se ha probado el efecto de E₂ como estrógeno feminizante en varias especies, en cíclidos se ha demostrado su efectividad en tres especies con rangos de aplicación de 30-120 mg Kg⁻¹ de dieta (Pandian & Sheela, 1995). Entre 2008 y 2009, Liu *et al.* (2013) feminizaron 5200 machos YY de bagre amarillo utilizando E₂ y se obtuvieron 4568 hembras fenotípicamente inducidas, con un promedio de 96 % y una supervivencia del 86 %.

La hormona E₂ ha sido uno de los componentes más eficaces para la feminización en salmónidos (Yamazaki, 1983; Dunham, 1990). En el salmón coho (*O. kisutch*) se ha

logrado revertir machos a hembras utilizando inmersiones de los embriones en $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de E_2 , seguido por una administración oral de 10 mg Kg^{-1} de E_2 a los alevines (Goetz *et al.*, 1979). La inmersión de alevines de salmón masu (*Oncorhynchus masou*) en $0.5\text{-}5 \mu\text{g L}^{-1}$ de E_2 ha logrado producir un 100 % de hembras (Nakamura, 1981).

Se ha comprobado que la feminización fenotípica es inducida exitosamente usando E_2 , ya que este esteroide está involucrado en varios aspectos de la reproducción como la síntesis de vitelogenina por parte del hígado o la producción de feromonas que atrae al macho en el salmón y el pez dorado (Yamazaki & Watanabe, 1979; Yamazaki, 1983). En la tilapia del Nilo existe poca información del uso de E_2 en la feminización para obtener machos YY. Se recomienda el uso de este estrógeno en los procesos de feminización en acuicultura ya que está disponible comercialmente y ocurre naturalmente en los organismos, lo que asegura pocos efectos secundarios negativos si es aplicado en concentraciones adecuadas y por último es muy potente en una gran cantidad de especies.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de dos concentraciones de estradiol-17 β , administradas oralmente, en la proporción de sexos, el crecimiento, el desarrollo gonadal y la composición corporal de la tilapia del Nilo (*O. niloticus*).

3.2 Objetivos particulares

3.2.1 Determinar el efecto de la concentración (60 y 120 mg Kg⁻¹) de estradiol-17 β , en la proporción de hembras y machos de la tilapia del Nilo.

3.2.2 Determinar el efecto de la concentración (60 y 120 mg Kg⁻¹) de estradiol-17 β , en el peso y la longitud de la tilapia del Nilo.

3.2.3 Evaluar el efecto de la concentración (60 y 120 mg Kg⁻¹) de estradiol-17 β , en el desarrollo gonadal de la tilapia del Nilo.

3.2.4 Determinar el efecto de la concentración (60 y 120 mg Kg⁻¹) de estradiol-17 β , en la concentración de lípidos y proteínas en el músculo de la tilapia del Nilo.

4. HIPÓTESIS

Mediante la alimentación oral con alimento adicionado con la hormonal estradiol-17 β de alevines sexualmente indiferenciados de tilapia del Nilo (*O. niloticus*) se podría obtener un incremento significativo en la proporción de hembras, sin afectar negativamente su crecimiento, desarrollo gonadal y composición corporal hasta la madurez sexual.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del experimento

El trabajo se llevó a cabo en la Unidad Acuícola Experimental de la Universidad del Papaloapan, campus Loma Bonita, Oaxaca, en las coordenadas 18° 06' latitud norte y 95° 53' longitud oeste, a una altura de 30 msnm (FAM, 2014).

5.2 Clima

El clima del lugar es cálido húmedo con lluvias abundantes en verano. La temperatura y precipitación anual promedio son de 25 °C y 1845.2 mm, respectivamente (FAM, 2014).

5.3 Tratamiento y diseño experimental

Se evaluaron durante 30 días dos concentraciones de la hormona estradiol-17 β ; 60 y 120 mg Kg⁻¹ y un grupo testigo, el cual no recibió hormona. La evaluación se realizó en una población con ambos sexos (hembras y machos). Para cada concentración de hormona y el grupo testigo se utilizaron tres replicas. La unidad experimental utilizada estuvo compuesta por acuarios de acrílico con capacidad de 85 L y los alevines se sembraron a densidad de cultivo de 4 alevines/L bajo un sistema de circulación cerrada (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resumen de tratamiento y diseño experimental.

Tratamiento	Dosis hormonal (mg Kg ⁻¹)	Replicas por tratamiento	Periodo de tratamiento (días)	Densidad de siembra (alevines/L)	Volumen por acuario (L)
Control	0	3	30	4	85
60	60				
120	120				

5.4 Desarrollo del experimento

5.4.1 Reproductores

Los reproductores de tilapia del Nilo que se utilizaron para esta investigación se obtuvieron del Centro Acuícola Temazcal (Oaxaca, México) y el Sistema Cooperativo Integral (Veracruz, México). Estos reproductores fueron aclimatados (28-31 °C) durante un año en la Unidad Acuícola Experimental de la Universidad del Papaloapan y alimentados con alimento comercial al 25 % de proteína (Nutripec[®], Agribands Purina, Irapuato Gto, México). Para obtener los desoves, los reproductores se colocaron en tanques de ferrocemento de 3 m de diámetro en una proporción de 3:1 (macho:hembra) durante 14 días.

5.4.2 Preparación del alimento hormonado

Para la feminización se utilizó la hormona estradiol-17 β (Sigma-Aldrich[®]), integrándola al alimento comercial a base de harina de pescado (Proteína 50 %, lípidos 15 %, fibra 2.5 %, cenizas 12 %, humedad 12 %, extracto libre de N 8.5 %) mediante el método de evaporación de alcohol propuesto por Guerrero (1975). La hormona se disolvió en etanol al 95 % que sirve como vehículo para adicionar la concentración deseada mediante el asperjado uniforme del alimento. Una vez adicionada la hormona al alimento, este se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente para permitir la evaporación del alcohol. Una vez seco, se almacenó en recipientes opacos a 4 °C hasta su utilización.

5.4.3 Producción de alevines en condiciones experimentales

Los alevines recién eclosionados y no diferenciados se colectaron utilizando una malla fina, después de sifonear 90 % del agua de los estanques. Se mezclaron en una cubeta de 20 L con aireación constante y se transportaron al sistema de circulación cerrado, donde

se sembraron al azar en 9 tanques de 85 L a una densidad inicial de 4 alevines/L. Se estableció un fotoperiodo de 12L:12O.

Los alevines fueron alimentados a saciedad aparente cada hora durante 30 días. El flujo de agua en los acuarios se cerró durante 10 minutos antes de agregar el alimento con la intención de reforzar la alimentación y se abrió 15 minutos después de alimentar.

Se tomaron muestras de 30 alevines por réplica cada 10 días para tomar una imagen digital y medir la longitud estándar usando el software ImageJ[®] (versión 1.36). Se monitoreó la temperatura y el oxígeno diariamente, mientras que el pH y la concentración de amonio se evaluaron una vez por semana.

5.4.4 Crecimiento de juveniles en estanques de concreto con recirculación

Al finalizar el período de tratamiento hormonal, todos los alevines de cada tratamiento fueron contados y medidos para calcular la tasa de supervivencia y la longitud estándar promedio.

Los alevines se terminaron de criar en jaulas flotantes de 1.2 m de diámetro y se alimentaron a saciedad aparente seis veces al día con alimento comercial no hormonado al 40 % de proteína durante otros 30 días, para después ser transferidos a estanques de concreto de 3 m de diámetro con agua fertilizada (agua con microalgas) y mantenidos hasta aproximadamente cinco meses de edad (hasta alcanzar la madurez sexual). Se alimentaron con alimento no hormonado (35 % de proteína), tres veces al día y subsecuentemente con alimento comercial (25 % de proteína) hasta los cinco meses de edad. Se midió la longitud estándar y el peso húmedo obtenido cada 21 días en 30 individuos por tratamiento.

5.4.5 Evaluación de la proporción de sexos e identificación de hembras revertidas

El sexo de los peces de cada tratamiento se determinó por examinación visual utilizando un marcador (azul de metileno al 1 %) para resaltar la estructura de la papila genital. Cada pez fue clasificado como macho, hembra o atípico. Una muestra de 50 peces de cada sexo (incluyendo atípicos) fue pesada, medida y sexada de nuevo mediante la extracción de la gónada y los ductos ováricos y espermáticos. Antes de la extracción gonadal todos los peces recibieron un masaje abdominal con el objetivo de determinar el lugar preciso de la expulsión de los gametos.

Las gónadas fueron clasificadas como ovarios, testículos o intersexo. Los organismos con papila de hembra y ovarios fueron clasificadas como hembras, mientras que los individuos que presentaron papila de macho y testículos fueron clasificados como machos. Los organismos que presentaron papila atípica (apariencia externa de macho o con un cuasi-oviducto) y ovarios fueron clasificados como hembras revertidas (machos genéticos) (Alcántar-Vázquez *et al.*, 2014).

5.5 Desarrollo gonadal

Las gónadas fueron preservadas durante 48 horas en una solución Davidson antes de ser fijadas en una solución de formalina al 4 %. Posteriormente fueron embebidas en parafina y cortadas en secciones de 5 μm y teñidas en una solución hematoxilina-eosina para su observación al microscopio óptico.

5.6 Composición corporal

Los análisis se realizaron en muestras obtenidas de la parte lateral de pez (masa muscular superior y ventral, que incluye músculo blanco y oscuro). El músculo fue fileteado en

grosos de 0.5 cm y secado en horno a 55 °C durante 12 horas. Una vez secas las muestras se trituraron, tamizaron y se analizaron en cuanto a lípidos y proteínas, utilizando los métodos 954.01 y 920.39 de la AOAC (1997).

5.7 Análisis estadístico

Las diferencias en longitud estándar y peso húmedo fueron analizadas usando un análisis de varianza de una vía mediante el programa Statistica (v. 9). La proporción de sexos, porcentaje de supervivencia y diferencias en la composición corporal entre los diferentes tratamientos fueron transformados mediante la función arcoseno antes de ser analizadas mediante un análisis de varianza de una vía. En los casos donde, se observaron diferencias significativas se aplicó una prueba de Tukey.

6. RESULTADOS

6.1 Periodo de alevín

La longitud estándar de los alevines mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) a partir de los 20 días, donde el valor observado de longitud estándar en el grupo tratado con la dosis de 60 mg Kg⁻¹ fue significativamente ($P < 0.05$) menor al observado en el grupo control y al grupo tratado con una dosis de 120 mg Kg⁻¹ de E₂. Al finalizar el periodo de tratamiento no se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre los tres grupos analizados (Cuadro 5).

Cuadro 5. Supervivencia y longitud estándar durante el periodo de alevín de la tilapia del Nilo tratada con estradiol-17 β a diferentes dosis.

Dosis hormonal (mg Kg ⁻¹)	Longitud estándar (cm)				
	Inicial	10 días	20 días	30 días	Supervivencia
Control	0.8±0.02 ^a	1.3±0.02 ^a	1.9±0.05 ^a	3.1±0.10 ^a	95±3.0 ^a
60	0.8±0.01 ^a	1.2±0.03 ^a	1.6±0.04 ^b	2.4±0.08 ^b	90±5.0 ^a
120	0.8±0.01 ^a	1.2±0.03 ^a	1.9±0.05 ^a	2.9±0.07 ^a	93±4.0 ^a

Los valores en cada columna marcados con un superíndice diferente indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Media \pm E.S. (n=3).

6.2 Supervivencia final y proporción de sexos

Al finalizar el experimento no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la supervivencia entre el grupo control y los grupos tratados con E₂. Durante el proceso de sexado se observaron peces cuya papila era más pequeña que la de los machos, al extraer la gónada se determinó que la presencia de esta papila atípica se caracterizaba por la presencia de ovarios, pero no de un oviducto, estos peces se consideraron hembras revertidas, pero no se contabilizaron como hembras. Sin embargo, sólo se consideraron como hembras revertidas funcionales a aquellos peces atípicos que tras aplicar un suave masaje abdominal expulsaron huevos en buen estado. Observaciones posteriores

revelaron que los huevos obtenidos de peces atípicos fueron expulsados por un cuasi-oviducto cercano a los vasos deferentes masculinos o a través de los vasos deferentes masculinos. Los peces cuyas características sexuales (papila genital y gónadas) fueron normales se contabilizaron como machos o hembras.

Al analizar la distribución de sexos al final del experimento (5 meses de edad) se encontró que en el grupo tratado con una dosis de 120 mg Kg⁻¹ de E₂ se obtuvo un porcentaje significativamente ($P < 0.05$) menor de machos comparado con el grupo tratado con una dosis de 60 mg Kg⁻¹ de E₂ y con el grupo control (Cuadro 6). No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje de hembras de los tres grupos. Sin embargo, el porcentaje de hembras revertidas y hembras revertidas funcionales encontradas en el grupo tratado con la dosis de 120 mg Kg⁻¹ fue significativamente ($P < 0.05$) mayor al del grupo tratado con la dosis de 60 mg Kg⁻¹.

Cuadro 6. Supervivencia y la distribución de sexos de la tilapia del Nilo tratada con estradiol-17 β a diferentes dosis durante 30 días.

Dosis hormonal (mg Kg ⁻¹)	Distribución de sexos (%)				
	Supervivencia	Machos	Hembras	Hembras revertidas	Hembras funcionales revertidas
Control	91±2.0 ^a	59.6±2.1 ^a	40.4±2.1 ^a	--	--
60	88±3.0 ^a	40.1±1.6 ^b	39.6±1.2 ^a	20.6±2.5 ^b	80.1±2.0 ^b
120	90±2.0 ^a	30.2±3.0 ^c	39.7±2.9 ^a	30.1±1.5 ^a	88.5±2.1 ^a

Los valores en cada columna marcados con un superíndice diferente indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Media \pm E.S. (n=3).

6.3 Crecimiento post-tratamiento hormonal

Al finalizar el experimento, el peso húmedo de los machos en cada grupo fue significativamente ($P < 0.05$) mayor al de las hembras, siendo los machos del grupo tratado con la dosis de 60 mg Kg⁻¹ significativamente ($P < 0.05$) más pesados que los

machos del grupo control. No se observaron diferencias significativas entre las hembras normales y las hembras revertidas en ninguna de las dosis evaluadas. Las hembras normales tratadas con la dosis de 120 mg Kg^{-1} fueron significativamente ($P < 0.05$) menos pesadas que las hembras del grupo control (Figura 5).

De igual forma, al peso húmedo los machos fueron significativamente ($P < 0.05$) más largos que las hembras en los tres grupos analizados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los machos de los diferentes grupos ni entre las hembras de los diferentes grupos.

6.4 Desarrollo gonadal

En la Figura 6 se observa que la arquitectura del tejido o el desarrollo celular de los testículos de los machos tratados con E_2 no fue diferente a la arquitectura y distribución de las células espermáticas observadas en las secciones histológicas de los testículos de los machos del grupo. Por otro lado, las secciones histológicas de las hembras revertidas mostraron un desarrollo gonadal caracterizado por la presencia de ovocitos en vitelogénesis en etapa inicial, media y avanzada, mientras que las secciones histológicas de las hembras del grupo control y las de las hembras (normales) expuesta a E_2 muestran ovarios normales, caracterizados por la presencia exclusiva de ovocitos en vitelogénesis avanzada. No se observó tejido testicular en ninguna de las hembras revertidas analizadas.

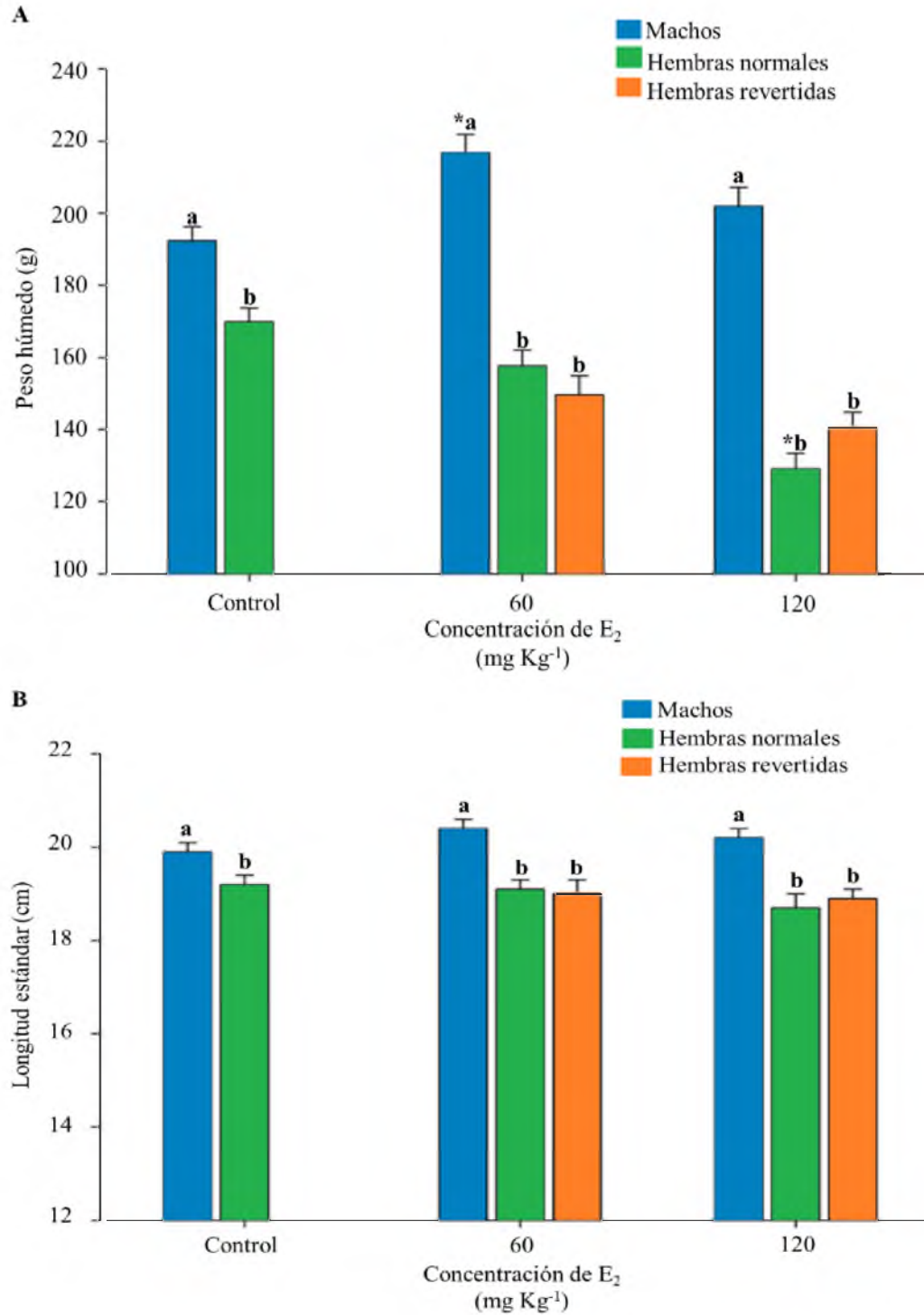


Figura 5. Crecimiento a los cinco meses de edad de tilapia del Nilo tratada con estradiol-17 β a diferentes concentraciones por 30 días. **(A)** Peso húmedo y **(B)** Longitud estándar. Las barras representan la media \pm E.S. Diferencias significativas con el grupo control $*P < 0.05$. Los valores en cada columna marcadas con diferente letra indican diferencias significativas entre sexos ($P < 0.05$).

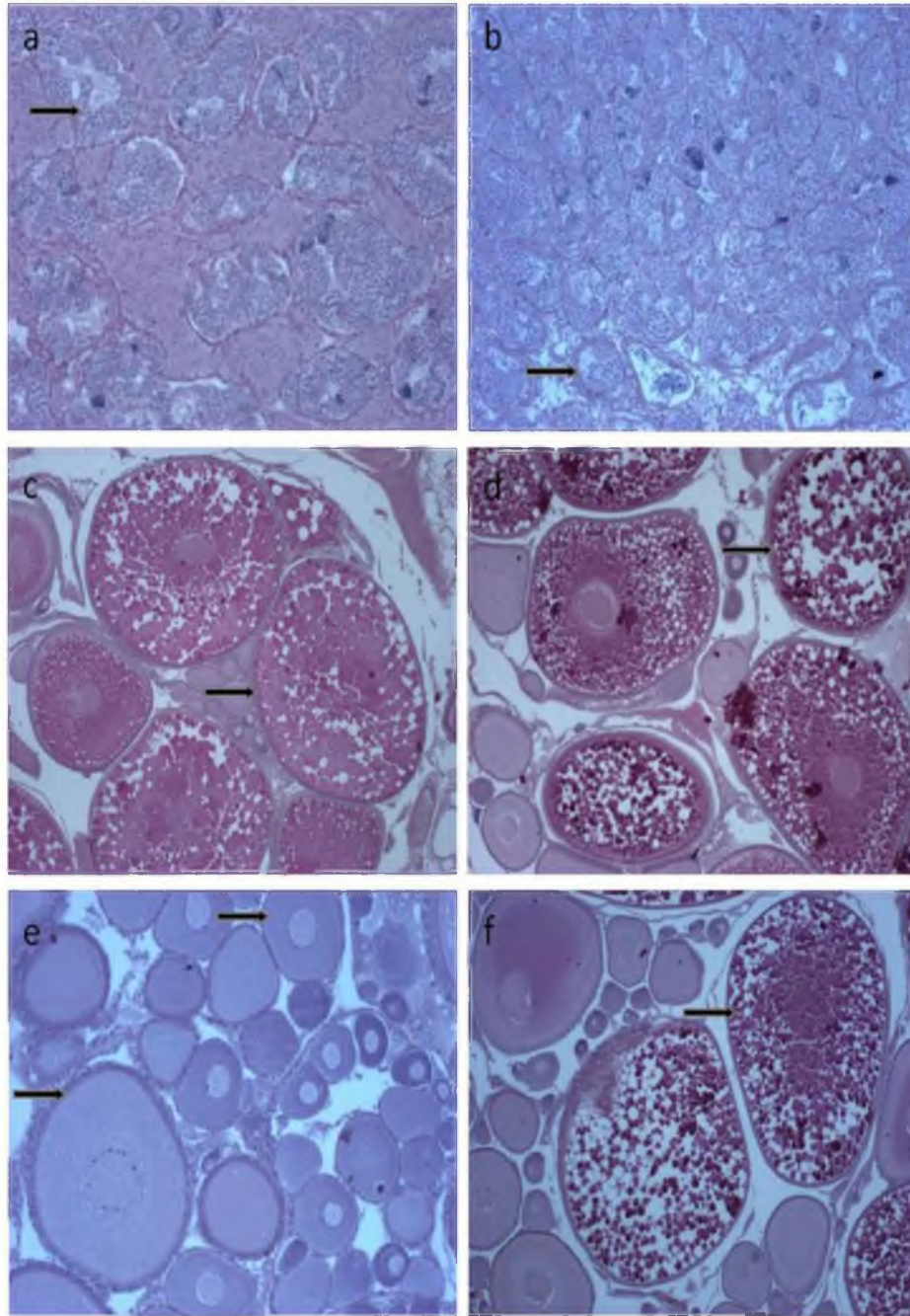


Figura 6. Sección transversal de las gónadas **(a)** Testículo del grupo control y **(b)** Testículo de organismo tratado con E₂, ambos muestran túbulos seminíferos normales y desarrollo celular, **(c)** Ovario de hembras del grupo control y **(d)** Ovario de hembras tratadas con E₂, ambos caracterizados por ovocitos en estado avanzado de vitelogénesis, **(e)** Ovario de hembra revertida con ovocitos en etapa inicial y media de vitelogénesis y **(f)** Ovario de hembras revertidas con ovocitos en vitelogénesis avanzada. Paneles a y b son X10 y c-f son X20.

6.5 Composición corporal

Las hembras revertidas de ambas concentraciones mostraron un porcentaje de lípidos en músculo significativamente ($P < 0.05$) mayor en comparación con el observado en las hembras y machos del grupo control. El valor significativamente más bajo de lípidos en músculo se observó en las hembras tratadas con la concentración de 120 mg Kg^{-1} de E_2 . Por otro lado, en contraste a los lípidos en músculo, la proteína en el músculo de las hembras revertidas se redujo significativamente ($P < 0.05$) comparado con el observado en las hembras y machos del grupo control. Las hembras tratadas con E_2 a una concentración de 60 mg Kg^{-1} mostraron un porcentaje de proteína en músculo significativamente ($P < 0.05$) mayor en comparación con el resto de los organismos de los tres grupos analizados (Figura 7).

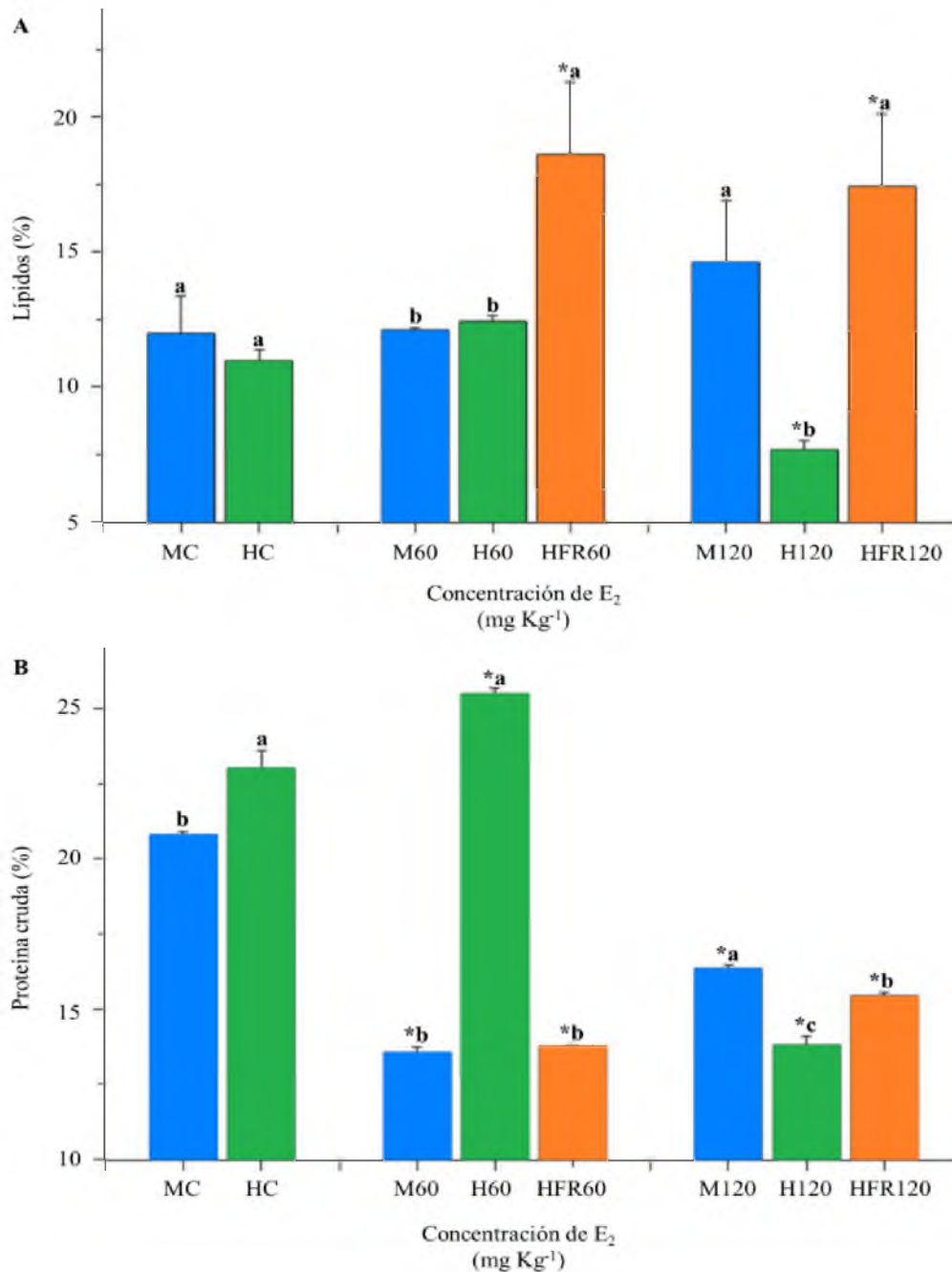


Figura 7. Composición corporal del músculo (% de peso seco) **(A)** lípidos y **(B)** proteína cruda. Las barras representan la media \pm E.S. de tres replicas. **MC** machos del grupo control, **HC** hembras del grupo control, **M60** machos tratados a una dosis de 60 mg Kg⁻¹ de E₂, **H60** hembras tratadas a una dosis de 60 mg Kg⁻¹, **HFR60** hembras revertidas con una dosis de 60 mg Kg⁻¹ de E₂, **M120** machos tratados hormonalmente a una dosis de 120 mg Kg⁻¹ de E₂, **H120** hembras tratadas con una dosis de 60 mg Kg⁻¹ de E₂, **HFR120** hembras revertidas a una dosis de 120 mg Kg⁻¹ de E₂. Las diferencias significativas con respecto al grupo control están marcadas por un asterisco (* $P < 0.05$). Los valores en cada columna marcadas con letra diferente indican diferencias significativas entre sexos ($P < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

La proporción de hembras revertidas obtenida fue superior en comparación a lo reportado en trabajos previos para especies de tilapia usando E₂ (Hopkins *et al.*, 1979; Jensen & Shelton, 1979; Bombardelli & Hayashi, 2005). Estos resultados pueden estar relacionados con la longitud estándar inicial promedio de los alevines (8 mm) al momento de la primera alimentación. Vera-Cruz *et al.* (1996) recomiendan para la tilapia del Nilo que los alevines utilizados en un proceso de reversión hormonal tengan una longitud promedio inicial menor a 10 mm al momento de la primera alimentación para asegurar una exitosa feminización. Por otro lado, Melard (1995) menciona que condiciones físico-químicas adecuadas y una alimentación continua durante periodos de 12 horas pueden mejorar el apetito y por lo tanto la asimilación del E₂. Adicionalmente, Abucay & Mair (1997) sugieren que los tratamientos de reversión sexual podrían ser más exitosos en sistemas de recirculación cerrada donde los metabolitos o lixiviados se mantienen en el flujo de agua por mayor tiempo en comparación con sistemas abiertos.

A pesar de la aparente mejora en la asimilación de E₂, el tratamiento hormonal no afectó la supervivencia ni la tasa de crecimiento de los alevines. Se ha reportado que los estrógenos no afectan el crecimiento en los peces, a diferencia de los andrógenos (Johnstone *et al.*, 1979; Piferrer, 2001). Sin embargo, varios autores han observado una mejoría en el crecimiento usando estrógenos sintéticos y naturales (Cowey *et al.*, 1973; Yu *et al.*, 1979; Varadaraj, 1989; Degani, 1986; Chiba *et al.*, 1993). También se ha observado un efecto negativo, pero únicamente en dosis altas (200 a 1000 mg Kg⁻¹) (Varadaraj, 1989; Melard, 1995; Piferrer, 2001). El menor crecimiento (longitud estándar) que se observó al final del periodo del tratamiento hormonal en la dosis de 60 mg Kg⁻¹ de

E₂, probablemente fue el resultado de un tratamiento de formalina aplicado para controlar un brote de trichodiniasis (*Trichodina* sp.). Este tratamiento fue aplicado a todos los grupos dos semanas después de comenzar el experimento, pero únicamente los organismos tratados con la concentración de 60 mg Kg⁻¹ mostraron una reducción temporal en el consumo de alimento después del tratamiento.

Las diferencias en crecimiento observadas post-tratamiento entre los machos y las hembras (incluyendo hembras revertidas) probablemente están más asociadas al dimorfismo sexual de esta especie que a un efecto del tratamiento con E₂. Toguyeni *et al.* (1996) reportan que los machos de tilapia del Nilo mostraron tasas de crecimiento mayores que las hembras, lo cual se relacionó directamente a las hormonas sexuales o bien indirectamente al comportamiento reproductivo (cuidado de las crías en la cavidad bucal) y factores fisiológicos (una alta cantidad de energía metabólica requerida para la producción de huevos) (Nonglak *et al.*, 2012). En este trabajo, no se observaron diferencias en el crecimiento entre las hembras revertidas y hembras normales. Un crecimiento similar entre los peces revertidos y los normales ha sido previamente reportado en la tilapia del Nilo (Nonglak *et al.*, 2012) y en la tilapia de Mozambique (Sparks *et al.*, 2003). Magurran & García (2000) mencionan que el crecimiento es una característica relacionada al sexo y regulada por hormonas sexuales y es influenciado por la genética y el ambiente, y se manifiesta después de la diferenciación sexual. Por lo tanto, un tratamiento hormonal aplicado antes de la diferenciación sexual podría modificar los patrones de crecimiento en peces revertidos. Patrones de crecimiento similares entre hembras normales y hembras revertidas podrían indicar una feminización completa a nivel hormonal (gonadal) y metabólico.

Varios autores han reportado la presencia de peces atípicos después de un proceso de masculinización o feminización (Hopkins *et al.*, 1979; Jensen & Shelton, 1979; Calhoun & Shelton, 1983; Bye & Lincoln, 1986; Feist *et al.*, 1995; Potts & Phelps, 1995). Los peces atípicos se caracterizan por tener papila anormal o en algunas ocasiones por tener ovarios, pero una papila masculina. En general, estos peces son descartados porque se considera que carecen de un oviducto funcional. En este trabajo, los peces atípicos fueron considerados hembras revertidas, pero únicamente de los peces que se obtuvieron muestras de huevos vía un masaje abdominal fueron considerados hembras funcionales y por lo tanto seleccionadas como reproductores para el siguiente paso en la producción de machos YY (Mair *et al.*, 1997). Es posible que el proceso de feminización haya sido completado a nivel fisiológico en los peces atípicos, pero los canales asociados con el oviducto no se formaron adecuadamente y la papila retuvo su forma masculina. Gimeno *et al.* (1998) reportan en la carpa común *Cyprinus carpio*, que 20 días de exposición a E₂ fueron suficientes para inducir la formación de oviductos en lugar de vasos deferentes masculinos. A pesar de que el periodo de tratamiento del presente trabajo fue más largo (30 días) y logró un cambio fisiológico completo, bajos niveles de ingesta de hormona o la interacción con variables ambientales (temperatura del agua moderadamente elevada) pudieron resultar en una feminización incompleta a nivel morfológico. Lo anterior parece ser apoyado por el hecho de que algunos peces atípicos presentaron ovarios bien desarrollados (identificados después de la extracción gonadal), pero el masaje abdominal aplicado fue ineficaz para obtener una muestra de huevos. En algunos casos, fue posible observar peces atípicos con abdomen distendido. Al realizar la extracción de la gónada se observó un ovario de talla anormal (grande), acumulación de líquido extracelular y en algunos casos tejido ovárico roto con huevos liberados dentro de la cavidad visceral.

Análisis posteriores revelaron que estos peces carecían de vasos deferentes masculinos y el oviducto no se formó adecuadamente, como consecuencia de una transición incompleta de papila masculina a femenina. Esta situación probablemente deja los oocitos sin un canal adecuado para ser expulsados. Feist *et al.* (1995) reportan resultados similares en la trucha arcoíris, en este caso, una alta proporción de machos revertidos fueron producidos por inmersión y alimentados con 17α -metiltestosterona. Sin embargo, la mayoría de los machos presentaron ductos espermáticos incompletos o bien carecían de ellos y el semen tuvo que ser obtenido quirúrgicamente. En el presente trabajo, en los casos donde una muestra de huevos pudo ser obtenida a través de un masaje abdominal, fue posible observar en aproximadamente 10 % de los casos, que los huevos obtenidos estaban reventados, probablemente resultado de la expulsión de los huevos por un cuasi-oviducto no formado adecuadamente o a través de vestigios de vasos deferentes no adecuados para expulsar huevos.

Wang & Tsai (2000) reportan que la exposición de alevines de 10 días de edad a temperaturas elevadas (28-32 °C) induce masculinización gonadal e incrementa la proporción de machos. En el presente estudio, el rango de temperatura del agua fue de 27 a 29 °C (28 ± 1 °C) durante todo el tratamiento con E_2 , por lo tanto, es posible que la temperatura del agua pudiera tener un efecto, aumentando la proporción de machos observada en el grupo control (59.6 %). Resultados similares han sido observados por Contreras-Sánchez (2001) en un grupo control (~60 %) de tilapia del Nilo mantenido a una temperatura de 28 ± 1 °C durante un proceso de masculinización. Estos resultados y los observados en nuestro experimento, sugieren que una tendencia genética hacia la masculinización de las gónadas a temperaturas moderadamente elevadas podría ser

responsable de la producción de machos observados. Wang & Tsai (2000) sugieren que la diferenciación sexual es un mecanismo dependiente de la temperatura y que la producción reductasa y/o receptores de andróginos provocaría la producción de machos y con esto un cambio hacia un desarrollo masculino en las gónadas.

Considerando la sensibilidad a la temperatura observada en el grupo control, es probable que los grupos tratados fueran también afectados por la temperatura del agua mantenida durante el tratamiento con E₂. Aunque las hormonas sintéticas 17 α -etinilestradiol y dietilestilbestrol han mostrado tasas de feminización mayores que la hormona natural E₂ en especies similares, se esperaba una proporción más elevada de hembras revertidas alimentando a los alevines a saciedad aparente a intervalos de 1 hora por 30 días. Nuestros resultados sugieren que esta sensibilidad a la temperatura del agua puede ser tan importante durante el proceso de feminización como el régimen alimenticio o la duración del tratamiento hormonal. Experimentos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado un incremento en la proporción de hembras combinando la temperatura del agua con una dosis apropiada de E₂ (resultados aun sin publicar). Experimentos que involucren la temperatura y hormonas serán el siguiente paso para incrementar el número de hembras revertidas obtenidas durante el proceso de feminización.

El desarrollo gonadal fue normal en todos los peces analizados, indicando que las concentraciones de E₂ usadas en el presente estudio fueron las adecuadas. Varios autores reportan efectos negativos en las gónadas masculinas después de una exposición a E₂ o sustancias similares (Billard *et al*, 1981; Gimeno *et al.*, 1998; Panter *et al.*, 1998). En nuestro caso, solo se observó una ligera reducción en el número de espermatozoides en los machos tratados con E₂. Aparentemente el efecto negativo del E₂ en el desarrollo de

los machos depende de la especie y la concentración de la hormona. Hopkins *et al.* (1979) reportan en la tilapia azul (*Tilapia aurea*), la presencia de gónadas anormales después de un periodo prolongado de tratamiento con diferentes estrógenos en 94 % de peces atípicos. En este trabajo, las hembras revertidas mostraron un desarrollo gonadal normal con oocitos en varios estados de desarrollo, pero no mostraron tejido testicular. Esto indica que la concentración de la hormona y la duración del tratamiento fueron adecuadas para la feminización completa a nivel fisiológico, a pesar de que los canales asociados a los oviductos no se formaran propiamente en un alto porcentaje de hembras revertidas.

Degani (1986) y Chiba *et al.* (1993) reportan un incremento en la cantidad de lípidos y una reducción del contenido de proteína en el músculo después de un tratamiento con E₂ en la anguila europea (*Anguilla anguilla*) y la anguila japonesa (*A. japonica*), respectivamente. En nuestro estudio el incremento en el contenido de lípidos fue particularmente marcado en las hembras revertidas, mientras que la reducción de proteína en el músculo fue similar en los grupos tratados con E₂ en comparación con el grupo control, excepto por las hembras tratadas con dosis de 60 mg Kg⁻¹. Chiba *et al.* (1993) sugieren que el E₂ puede jugar un rol en la regulación del metabolismo de las proteínas y lípidos en el músculo de los peces. Olivereau & Olivereau (1979) y Haux & Norberg (1985) reportan un descenso en los niveles de glicógeno en el hígado y un incremento del contenido de proteína después de inyecciones intramusculares repetidas de E₂ en hembras de la anguila dulceacuícola y la trucha arcoíris, respectivamente. Es probable que un tratamiento sostenido (oral o intramuscular) de E₂ provoque efectos metabólicos opuestos en el hígado y el músculo. El incremento de los lípidos en el músculo probablemente es causado por la acumulación de glicógeno y otros productos lipídicos resultado de una

estimulación excesiva por parte del E₂ en el hígado. Panter *et al.* (1998) reportan un incremento en la síntesis de vitelogenina después de exposición a E₂ en carpa cabezona (*Pimephales promelas*). Finalmente, Hoar *et al.* (1983) y Nagahama (1994) sugieren que, durante la maduración sexual, el E₂ actúa en el hígado para estimular la producción de vitelogenina. Esto apoya la idea de que el incremento de lípidos en el músculo está probablemente relacionado con la acción de E₂ en el hígado. La reducción del contenido de proteína en el músculo posiblemente está ligado al cambio en las vías metabólicas entre el músculo y el hígado. El incremento en la capacidad del hígado para sintetizar nuevas proteínas (Haux & Norberg, 1985) después de un tratamiento con E₂ apoya esta idea.

El éxito en la feminización del genotipo XY es un paso esencial en el desarrollo de la tecnología de los machos YY. A pesar de que en nuestro estudio la proporción de hembras revertidas con oviductos funcionales fue más baja (~20 %) de lo esperado utilizando sistema cerrado e incrementando la tasa de alimentación, fue posible producir un número suficiente de hembras funcionales revertidas para volver factible la producción de machos YY, a través de la cruce de hembras revertidas (XY) con machos normales (XY). Sin embargo, en estudios posteriores, será necesario combinar el uso de hormonas con la temperatura del agua, para optimizar el número de hembras revertidas obtenidas y lograr la feminización completa de la papila genital. Adicionalmente estudios comparativos de la fisiología y el comportamiento sexual de hembras revertidas podrían contribuir a entender los cambios causados por la administración de E₂ en los estados subsecuentes de desarrollo del pez, esto con el objetivo de seguir desarrollando la tecnología YY y permitir su establecimiento a escala comercial en la región del Papaloapan.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Las concentraciones de estradiol-17 β utilizadas fueron efectivas en inducir la reversión sexual de machos genéticos durante el periodo lábil.
- 2.- La aplicación de E₂ en las concentraciones utilizadas no produce efectos negativos en el desarrollo gonadal de los peces revertidos.
- 3.- La reversión sexual produce una alteración de los patrones de crecimiento de las hembras revertidas (machos feminizados), haciéndolos similares a los observados en hembras normales.
- 4.- La aplicación de E₂ produce un cambio en las concentraciones de lípidos y proteínas en músculo de las hembras revertidas, asociado probablemente a la interacción del E₂ con el hígado de los peces.
- 5.- La presencia de hembras atípicas indica una reversión sexual incompleta a nivel morfológico en algunos de los machos expuestos a estradiol-17 β .

9. RECOMENDACIONES

- 1.- Combinar el uso de E₂ con una temperatura baja de cultivo durante el periodo de alevín para maximizar los porcentajes de hembras revertidas obtenidas.
- 2.- Evaluar los perfiles de aminoácidos en el músculo de las hembras revertidas para evaluar con mayor precisión los cambios en los niveles de proteínas observados.
- 3.- Caracterizar la morfología de la papila genital de los peces atípicos para poder identificarlos más eficientemente en experimentos posteriores.
- 4.- Evaluar el desempeño reproductivo de las hembras atípicas obtenidas.

10. LITERATURA CITADA

- Abucay J.S. & Mair G.C. 1997. Hormonal sex reversal of tilapias: implications of hormone treatment application in closed water systems. *Aquac. Res.* 28: 841-845.
- Alcántar-Vázquez J.P., Moreno-De La Torre R., Calzada-Ruiz D. & Antonio-Estrada C. 2014. Production of YY-Male of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* from atypical fish. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 42 (3): 644-648.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1997. Official Methods of analysis of AOAC international. 16th ed, 3rd revision. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, VA, USA.
- Baroiller J.F., D'Cotta H., Bezault E., Wessels S. & Hoerstgen-Schwark G. 2009. Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 153: 30-38.
- Beardmore J.A., Mair G.C. & Lewis R.I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture* 197: 283-301.
- Bezault E., Ozouf-Costaz C., D'Hont A., Volff J.N., Rognon X. & Baroiller J.F. 2001. Structure and evolution of pure and hybrid genomes of *Tilapia* (Pisces, Cichlidae). *Chromosome Res.* 9(1): 30.
- Billard R., Breton B. & Richard M. 1981. On the inhibitory effect of some steroids on the spermatogenesis in adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Zool.* 59: 1479-1487.

- Bombardelli A.R. & Hayashi C. 2005. Feminilização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com valerato-de-estradiol. *R. Bras. Zootec.* 34: 357-364.
- Bye V.J. & Lincoln R.F. 1986. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* 57: 299-309.
- Calhoun W.E. & Shelton W.L. 1983. Sex ratios of progeny from mass spawnings of sex-reversed broodstock of *Tilapia nilotica*. *Aquaculture* 33: 365-371.
- Chevassus B., Devaux A., Chourrout D. & Jalabert B. 1988. Production of YY rainbow trout males by self-fertilization of induced hermaphrodites. *J. Hered.* 79: 89-92.
- Chiba H., Iwatsukis K., Hayami K. & Yamauchi K. 1993. Effects of dietary estradiol-17 β on feminization, growth and body composition in the japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 367-371.
- Cnaani A. & Hulata G. 2008. Tilapias. En: *Genome Mapping and Gnomics in Animals*. Kocher T.D. & Kole C. (Eds.). Vol 2. pp. 101-116. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- CONAPESCA. 2013. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2013. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Disponible en: <http://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2013/>
- Contreras-Sánchez W.M. 2001. Sex determination in Nile tilapia: *Oreochromis niloticus*: Gene expression, masculinization methods and environmental effects. Ph.D. Thesis, Oregon State University, USA. 193 p.

- Cowey C.B., Pope J.A., Andron J.W. & Blair A. 1973. Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of oral administration of diethylstilbesterol and cyroheptadiene on the growth of *Pleuronectes platessa*. *Mar. Biol.* 19: 1-6.
- Daza V.P., Parra L. & Ochoa S. 2005. Reproducción de los peces en el trópico. Universidad Nacional de Colombia. INCODER. 241 p.
- Degani G. 1986. Effect of dietary 17- β -estradiol and 17- α -methyltestosterone on growth and body composition of slow growing elvers. *Anguilla anguilla* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 85A: 243-247.
- Donaldson E.M. 1986. The integrated development and application of controlled reproduction techniques in Pacific salmonid aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* 2: 9-24.
- Dunham R.A. 1990. Production and use of monosex or sterile fishes in aquaculture. *Rev. Aquat. Sci.* 2: 1-17.
- Dunham R.A. 2004. Aquaculture and Fisheries Biotechnology. Genetic Approaches. CABI Publishing. British Library. Londres, Reino Unido.
- Dunham R. A. 2012. Genetics. En: Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants. Lucas J.S. & Southgate P.C. (Eds). Blackwell Publishing Ltd. Iowa.
- FAM 2014. Fuerza Aérea Mexicana. Estadística Meteorológica Mensual. Dirección de Servicio Meteorológico. Estación Loma Bonita, Oaxaca, México.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura. Roma.

- Feist G., Yeoh C.G., Fitzpatrick M.S. & Schreckb C.B. 1995. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture* 131: 145-152.
- FishStatJ 2016. Estadísticas mundiales de pesca y acuicultura de la FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstati/en>.
- Gilling C.J., Skibinski D.O.F., & Beardmore, J. A., 1996. Sex reversal of tilapia fry by immersion in water containing oestrogens. En: Pulli R.S.V., Lazard J., Legendre M., Amon-Kottias J.B. & Pauly D. (Eds). The Third International symposium on Tilapia in Aquaculture. Manila, Philippines, p. 314-319.
- Gimeno S., Komen H., Gerritsen A.G.M. & Bowmer T. 1998. Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquat. Toxicol.* 43: 77-92.
- Goetz F.W., Donaldson E.M., Hunter G.A. & Dye H.M. 1979. Effects of estradiol 17 β and 17 methyl-testosterone on gonadal differentiation in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 17: 267-278.
- Guerrero R. 1975. Use of androgens for the production of all-male tilapia aurea (Steindachner). *Tran. Amer. Fish. Soc.* 2: 342-348.
- Haux C. & Norberg B. 1985. The influence of estradiol-17 β on the liver content of protein, lipids, glycogen and nucleic acids in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 81: 275-279.
- Hoar W.S., Randall D.S. & Donaldson E.M. 1983. *Fish physiology*. Vol IX. Academic Press, England. 477 p.

- Hopkins D.K., Shelton L.W. & Engle R.C. 1979. Estrogen sex-reversal of *Tilapia aurea*. *Aquaculture* 18: 263-268.
- Hunter G.A. & Donaldson E.M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. *Fish Physiol. Biochem.* 9: 223-304.
- Jensen G.L. & Shelton W.L. 1979. Effects of estrogens on *Tilapia aurea*: implication for production of monosex genetic male tilapia. *Aquaculture* 16: 233-242.
- Jiménez B.M. L. & Arredondo J.L. 2000. Manual técnico para la reversión sexual de tilapia. Serie Desarrollos Tecnológicos. Universidad Autónoma Metropolitana. 36 p.
- Johnstone R., Simpson T.H. & Youngson A.F. 1979. Sex reversal in salmonid culture. Part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. *Aquaculture* 18:13-19.
- Kavumpurath S. & Pandian T.J. 1993. Production of YY male in the guppy, *Poecilia reticulata*, by endocrine sex reversal and progeny testing. *Asian Fish Sci.* 5: 265-276.
- Leet K.J., Gall E.H. & Sepúlveda M.S. 2011. A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. *J. Appl. Toxic.* 31(5): 379-398.
- Liu H., Guan B., Xu J., Hou C., Tian H. & Chen H. 2013. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale breeding of YY super-male and XY all-male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson)). *Mar Biotechnol.* 15: 321-328.

- Macaranas J.M., Mather P.B., Lal S.N., Vereivalu T., Lagibalavu M. & Capra M.F. 1997. Genotype and environment: A comparative evaluation of four tilapia stocks in Fiji. *Aquaculture* 150: 11-24.
- Magurran A.E. & Garcia C.M. 2000. Sex differences in behaviour as an indirect consequence of mating system. *J. Fish Biol.* 57: 839–857.
- Mair G.C., Abucay J.S., Skibinski D.F. & Beardmore J.A. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large scale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 396:404.
- Majumdar K.C. & McAndrew B.J. 1986. Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera: *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* of the tribe Tilapiini. *Genetica* 68: 165-168.
- Melard C. 1995. Production of a high percentage of male offspring with 17 α -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I. Estrogen sex-reversal and production of F2 pseudofemales. *Aquaculture* 130: 25-34.
- Müller B.A. & Hörstgen S.G. 2007. A YY-male *Oreochromis niloticus* strain developed from an exceptional mitotic gynogenetic male and growth performance testing of genetically all-males progenies. *Aquac. Res.* 38(7): 773-775.
- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Develop. Biol.* 38: 217-229.
- Nakamura M. 1981. Feminization of masu salmon *Oncorhynchus masou* by administration of estradiol-17 β . *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47: 1529.

- Nonglak P., Boonanuntanasarn S., Jangprai A., Yoshizaki G. & Na-Nakorn U. 2012. Pubertal effects of 17 α -methyltestosterone on GH-IGF-related genes of the hypothalamic-pituitary-liver-gonadal axis and other biological parameters in male, female and sex-reversed Nile tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177: 278-292.
- Olivereau M. & Olivereau J. 1979. Effect of estradiol-17 β on the cytology of the liver, gonads and pituitary, and on plasma electrolytes in the female freshwater eel. *Cell Tissue Res.* 199: 431-454.
- Pandian T.J. & Sheela S.G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138: 1-22.
- Panter G.H., Thompson R.S. & Sumpter J.P. 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquat. Toxicol.* 42: 243-253.
- Piferrer F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleosts fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
- Piferrer F. & Donaldson E.M. 1994. Uptake and clearance of exogenous estradiol-17 β and testosterone during the early development of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), including eggs, alevins and fry. *Fish Physiol. Biochem.* 3: 219-232.
- Potts A.D. & Phelps R.P. 1995. Use of diethylstilbestrol and ethynylestradiol to feminize Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in an outdoor environment. *J. Appl. Ichthyol.* 7: 147-154.

- Scott A.G., Penman D.J., Beardmore J.A. & Skibinski D.O.F. 1989. The YY supermale in *Oreochromis niloticus* (L.) and its potential in aquaculture. *Aquaculture* 78: 237-251.
- Shelton W.L., Hopkins K.D. & Jensen G.L. 1978. Use of hormones to produce monosex tilapia for aquaculture; En: Culture of exotic fishes. Smitherman R.O., Shelton W.L. & Grover J.H (Eds.). Auburn, American Fisheries Society. p. 10-33.
- Solar I.I., Baker I.J. & Donaldson E.M. 1987. Experimental use of female sperm in the production of monosex female stocks of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) at commercial fish farms. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Ci.* 1552: 14.
- Sparks T.T., Shepherd B.S., Ron B., Richman III H., Riley L.G., Iwama G.K., Hirano T. & Grau E.G. 2003. Effects of environmental salinity and 17 α -methyltestosterone on growth and oxygen consumption in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Phys. B.* 136 (4): 657-665.
- Suresh V. & Bhujel R. C. 2012. Tilapias. En: Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants. Lucas J.S. & Southgate P.C. (Eds). pp. 338-364. Blackwell Publishing Ltd. Iowa.
- Toguyeni A., Baroiller J.F., Fostier A., Le Bail P.Y., Kühn E.R., Mol K.A. & Fauconneau B. 1996. Consequences of food restriction on short-term growth variation and on plasma circulating hormones in *Oreochromis niloticus* in relation to sex, *Gen. Comp. Endocrinol.* 103: 167–175.

- Tran L.D., Dinh T.V., Ngo T.P. & Fotedar R. 2011. En: Recent Advances and New Species in Aquaculture. Fotedar R.K. & Phillips B.F. (Eds). pp. 319-333. Blackwell Publishing Ltd. Iowa.
- Varadaraj K. 1989. Feminization of *Oreochromis mossambicus* by the administration of diethylstilbestrol. *Aquaculture* 80: 337-341.
- Varadaraj K. & Pandian T.J. 1989 First report on production of supermale tilapia by integrating endocrine sex reversal with gynogenetic technique. *Curr. Sci. (Bangalore)* 58: 434-441.
- Vera-Cruz M.E., Mair C.G. & Marino P.R. 1996. Feminization of genotypically YY Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Asian Fish. Sci.* 9: 161-167.
- Vidal L.J., Contreras S.W., Álvarez G.C.A., Hernández F.A. & Hernández V. 2010. Técnicas de reversión sexual aplicadas en acuicultura. Laboratorio de Acuicultura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 6 p.
- Wang H.L. & Tsai L.C. 2000. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Zool.* 286: 534-537.
- Yamamoto T. 1969. Sex differentiation. En: Fish Physiology. Hoar W. & Randall D. (Eds). pp. 117-175. Academic Press.
- Yamazaki F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33:329-354.

- Yamazaki F. & Watanabe K. 1979. The role of steroid hormone in sex recognition during spawning behavior of the goldfish, *Carassius auratus* L. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad Part B*, 45 (5): 505-511.
- Yu T.C., Shinnhuber R.O. & Hendricks J.D. 1979. Effect of steroid hormones on the growth of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 16: 351-359.