



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

CAMPUS IZTACALA

BO 1246/96
Ej. 2

**“OBTENCION DE UNA POBLACION MONOSEXO
(HEMBRAS) DE *Xiphophorus helleri* (HECKEL,
1848), MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE
DIETHYLETILBESTROL EN EL ALIMENTO A
HEMBRAS GRAVIDAS”**

400282



61060

T E S I S

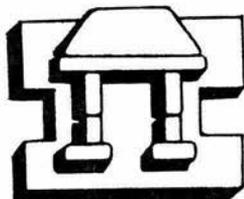
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

FABIOLA PEÑA AGUADO

DIRECTOR DE TESIS: BIOL. ALBA F. MARQUEZ ESPINOZA



IZTACALA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LA PRUEBA MAS CLARA DE SABIDURIA
ES UNA ALEGRIA CONTINUA

MONTAIGNE

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Javier Peña Guerra y Juana Aguado de Peña
Por su paciencia y apoyo constante
Por haberme dado el Don de la vida.
"Gracias"

A MIS HERMANOS

Patricia Nohemi, Adriana y Javier
Porque cuando las cosas se ponen difíciles
siempre estamos juntos y por la infancia
que nos une.

A MIS COMPAÑERAS Y AMIGAS

Rosa Elvira, Gloria, Alejandra,
Teresa, Martha, Silvia y Renata
Por las experiencias vividas durante
y después de la carrera.
Ojalá continúen.

A LOS COMPAÑEROS DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Por su amistad pasada y futura.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme ayudado a cumplir uno de mis sueños, cursar y concluir una carrera profesional.

A mi directora de Tesis Alba Márquez Espinoza por darme su invaluable apoyo y aliento constante sin el cual no hubiese tomado forma y buen fin éste proyecto.

A los Biólogos Mario A. Fernández Araiza, Rodolfo Cárdenas Reygadas, Martha E. Valdéz Moreno y la Dra. Norma A. Navarrete Salgado, por la revisión de éste escrito, por sus comentarios y sugerencias.

A los compañeros del laboratorio L-521, del acuario "Juan Luis Cifuentes Lemus" y técnicos académicos.

A los profesores que directa ó indirectamente colaboraron con la preparación de éste trabajo.

INDICE

Página

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
BIOLOGIA DE LA ESPECIE	5
ANTECEDENTES	8
OBJETIVOS	13
METODOLOGIA	14
COLECTA Y ACONDICIONAMIENTO DE ORGANISMOS	14
OBTENCION DE LA GENERACION F1	14
UBICACION GEOGRAFICA DEL LUGAR DE COLECTA	15
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL BIOENSAYO	16
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL ESTUDIO	17
PREPARACION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES	18
RESULTADOS Y DISCUSION	19
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
BIBLIOGRAFIA	35
APENDICE I	41
APENDICE II	42

RESUMEN

En éste trabajo se probó la efectividad de la Diethylstilbestrol para dirigir el desarrollo del sexo de embriones con el fin de obtener una población monosexo de hembras, ésta hormona fué administrada mediante el alimento a hembras grávidas de *Xiphophorus helleri*, peces de la familia Poeciliidae conocidos como cola de espada.

Primero se hizo un bioensayo para determinar el tiempo y las dosis a emplear durante el estudio. Las dosis usadas en el bioensayo fueron 25, 18.75, 12.5, 6.25 mg de Diethylstilbestrol por Kg de alimento y un grupo control, el tiempo de tratamiento fué durante el desarrollo embrionario y un mes más después del nacimiento. Las dosis utilizadas en el estudio fueron 5 mg/Kg, 7.5 mg/Kg, 10.0 mg/Kg, 12.5 mg/Kg y también un grupo control, durante únicamente el desarrollo embrionario, se hicieron observaciones de la morfología general del cuerpo de los organismos, y de la gónada tanto para las hembras adultas de la primera generación (F1), como para los organismos de la segunda (F2) hembras y machos.

En el bioensayo se encontró que las dosis de 25 y 18.75 mg/Kg producían altas mortalidades y las hembras nunca produjeron descendencia; con 12.5 mg/Kg se obtenía poca descendencia pero predominantemente de hembras y con 6.25 se logró una descendencia de 100% hembras.

La dosis donde se obtuvo mayor número de hembras en el estudio fué 10.0 mg/Kg con 84.3 %, seguida por 7.5 mg/Kg con 79.3 %; no observándose daños en las gónadas de las hembras F2 pero sí en los machos quienes resultaron ser estériles. Para todos éstos organismos de la F2 su morfología corporal en tamaño, forma y color no se vió afectada en ningún caso.

INTRODUCCION

En todas las épocas, el bienestar y la existencia misma del género humano han dependido en gran medida de los animales y plantas domésticas que le brindan alimento, vestido, medio de trabajo, de transporte y de distracción. (Jiménez y Auró, 1994). Un gran porcentaje de éstos organismos son de origen acuático como los peces, ranas, camarones, algas y muchos otros que han sido "seleccionados" por el hombre dando así origen a la acuicultura.

Hasta el día de hoy la acuicultura o cría y crecimiento de organismos acuáticos, en condiciones controladas, continúa siendo una novedad; en esencia es un intento que el hombre ha hecho desde tiempos antiguos para incrementar la producción de los recursos acuáticos por medio del manejo deliberado de ciertos procesos fisiológicos de los organismos (crecimiento y reproducción), acoplados a actividades culturales como la cosecha, procesamiento, comercialización y en su caso consumo de los mismos. (López, 1994)

La acuicultura en América Latina ha comenzado a diversificarse para integrarse a otros mercados más desarrollados como el de Estados Unidos de Norteamérica; Alemania en Europa y en Asia, Japón es el principal país que comercia con productos acuícolas algunos de los cuales proceden de México; una rama de ésta diversificación la constituye el acuarismo, actividad que incluye la colecta, producción, exhibición y comercialización de productos acuáticos ornamentales tanto para el esparcimiento como para la enseñanza. (Armijo, 1994)

En México se cuenta con un amplia variedad de especies de ornato tanto marinas como de agua dulce que representan un gran potencial acuacultural y que requieren mayor atención. (Jiménez y Auró, 1994).

Es por ello que actualmente se realiza mucha investigación respecto a las especies de ornato, primero porque la principal fuente proveedora de éstos organismos sigue siendo el medio natural, mermando considerablemente las poblaciones y segundo porque son animales con un alto potencial económico; algunas líneas de investigación en ésta área son la reproducción, el comportamiento, la genética de poblaciones, patrones de color y genes ligados al sexo.

→ Diversos estudios se han enfocado en inducir o revertir el sexo del pez para obtener poblaciones de un solo tipo, llamadas poblaciones monosexo (Yamazaki, 1983). Dado que el proceso de diferenciación sexual es diverso y lábil hace que la reversión sexual mediante hormonas sea posible en muchas especies de teleósteos. La inducción hormonal funciona como una poderosa herramienta para entender el proceso de diferenciación sexual y para producir poblaciones monosexo para la industria de la acuicultura. (Pandian y Sheela, 1995)

Tal es el caso de los cultivos de peces con importancia económica, donde se requiere la separación de organismos de acuerdo al sexo debido a que 1.- La madurez sexual es alcanzada rápidamente y el organismo no ha llegado a una talla comercial, presentándose entonces problemas de sobrepoblación, enanismo, infecciones y otros, 2.- Cuando se pretende cultivar a los organismos de mejor apariencia, color y tamaño, y 3.- Cuando se quiere lograr algún otro fin específico con una población monosexo.

Para lograr esto se han hecho estudios donde la separación de individuos por sexo se lleva a cabo mediante la selección manual, las cruces de especies para obtener híbridos y recientemente, en la industria de la acuicultura, ha tomado un gran interés la administración oral de hormonas (Pelissero y Sumpter, 1992), pudiendo ser esteroides naturales ó sintéticos.

Los estudios experimentales de manipulación sexual por medio de hormonas, se han incrementado y difundido debido al potencial económico de los cultivos en donde la producción de crías monosexo es importante como son los de tilapia, salmonidos y carpas entre otros. En los salmónidos la inversión sexual se ha realizado con estrógenos para producir hembras, incrementar la producción de huevo y para evitar la proliferación de bacterias y hongos asociados con el proceso de maduración sexual. (Hunter y Donaldson, 1983).

La producción de éste tipo de organismos ha permitido el desarrollo de líneas de hembras para un manejo posterior. Esta técnica ha sido aplicada también a ciprínidos para conseguir organismos de ornato con características morfológicas atractivas que vayan asociadas al sexo, así como evitar la reproducción en medios naturales, en donde la carpa herbívora se ha empleado como controlador de malezas acuáticas. (Shelton y Jensen, 1979)

La aplicación dirigida de hormonas, ya sea naturales o sintéticas, se hace básicamente de tres formas: Por inyección, por inmersión y a través del alimento, como antes se mencionó. Las dos primeras se usaron principalmente en los inicios de la utilización de técnicas de manipulación sexual, aunque actualmente se utilizan diversas combinaciones de las tres técnicas. (Hunter y Donaldson, 1983; UNAM, 1988)

La aplicación de la hormona en la dieta se ha popularizado debido a la introducción de esteroides sintéticos que contienen radicales metilo, etilo y propionato entre otros los cuales confieren al esteroide la propiedad de ser más estable y no degradarse al pasar por el tubo digestivo, principalmente por el hígado (Yamamoto, 1969; Hernández, 1988), y es debido también a que la hormona presente en el alimento, si se disuelve en el agua donde se hallan los peces, su actividad será mínima o nula. (Hunter y Donaldson, 1983)

La reversión sexual por medio de hormonas es, probablemente, permanente debido a que la acción de los genes sexuales está restringida a un corto periodo de tiempo durante el desarrollo temprano de las gónadas, quedando latentes o inactivos una vez concluida la diferenciación sexual de la gónada (Yamamoto, 1969). Pero, no sólo los genes determinan el sexo del pez sino que también intervienen decisivamente las hormonas sexuales como lo mencionan Chan y Yeung (1983), por lo que los esteroides deben ser administrados simultáneamente con la liberación de las

hormonas naturales e incluso antes de que ocurra la diferenciación de la gónada (Hunter y Donaldson, 1983).

Para obtener una población monosexo mediante hormonas es necesario que la gónada de los organismos a tratar tenga la potencialidad de desarrollarse ya sea como ovario o como testículo, que la especie a tratar presente dimorfismo sexual y un comportamiento sexual específico para poder evidenciar los cambios que se presenten. (Yamazaki, 1983)

La Diethylestilbestrol es un compuesto sintético, derivado del Dihidroxiestilbeno, que se introdujo en 1938, activo por vía oral con actividad estrogénica, no es un esteroide propiamente aunque por su estructura tridimensional tiene ciertas características en común con las hormonas esteroideas y por lo tanto actúa como tal. (Goldstein, 1978). (Fig. 1)

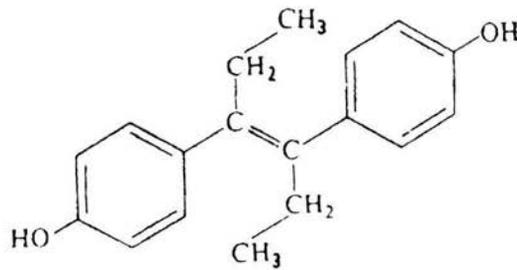


Fig. 1: Fórmula química de la hormona Diethylestilbestrol. (Tomada de Goldstein, 1978)

Datos experimentales sobre la reversión sexual en teleósteos, indican que la diferenciación del sexo comienza después del nacimiento de los organismos, justo antes o después de iniciar su alimentación. (Yamazaki, 1983)

En general, para todas las investigaciones realizadas se han usado crías en las que aún no se ha definido el sexo con la finalidad de que el primer alimento artificial que consuman contenga la dosis del esteroide que se desea probar y que iniciará el cambio morfofisiológico de la gónada pero, en poecílidos y otros peces vivíparos el sexo se diferencia antes del nacimiento, por lo que la administración de los esteroides debe iniciarse durante el desarrollo embrionario de los peces cuando aún se hallan en el ovario de las madres grávidas. (Yamazaki, op. cit.)

El hecho de que el sexo en el poecílido *X. helleri* se determine en el desarrollo embrionario (Kramer y Kallman, 1985), nos da ocasión para investigar si es posible dirigir dicha determinación del sexo, induciéndolo mediante la administración de la hormona Diethylestilbestrol a través del alimento a hembras grávidas, para así obtener una población monosexo de hembras; si ésto se logra en posteriores trabajos se podrá contar con poblaciones de hembras que produzcan mayores cantidades de crías y/o huevos, al contar con muchas hembras y pocos machos se reducirán los gastos de mantenimiento (Goetz, et. al., 1979). Por otro lado poblaciones de sólo hembras son preferidas en el cultivo de truchas arcoiris, debido a que los machos son propensos a madurar precozmente por lo que su crecimiento es menor y su conversión alimenticia es deficiente lo que hace decrecer su calidad acuacultural (Hunter y Donaldson, 1983); situación parecida ocurre con las tilapias ya que al ser los machos territorialistas aumentan el estrés entre los otros peces y cuando son cultivados en estanques naturales incrementan la turbidez del fondo cuando construyen nidos ocasionando pérdidas al productor (Basavaraja, 1990).

Finalmente, será posible obtener grupos de peces de ornato hembras para su venta a acuariófilos, una vez que se hallan determinado aquellas especies factibles de revertir el sexo y que desarrollen características morfológicas atractivas en las hembras.

BIOLOGIA DE LA ESPECIE

El pez espada *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848), perteneciente a la familia Poeciliidae, es un organismo dulceacuicola caracterizado por un marcado dimorfismo sexual en el cual los machos presentan la aleta caudal alargada y pigmentada (en forma de espada) y un órgano intromitente llamado gonopodio formado por radios modificados de la aleta anal. (Fig. 2)

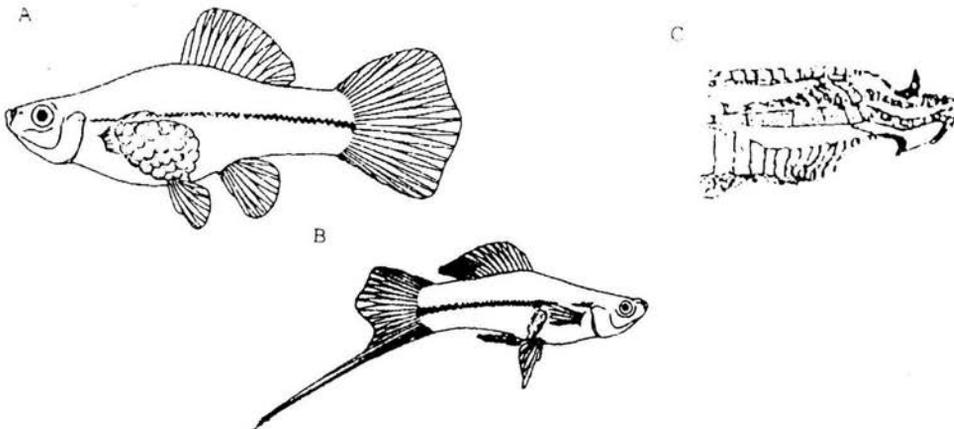


Fig. 2: A) Hembra y B) Macho de *X. helleri* (Tomado de Yamamoto, 1969); C) Porción distal del gonopodio. (Tomado de Melfe y Snelson, 1989)

El gonopodio favorece la fertilización interna de las hembras quienes, de acuerdo con Tavolga (1949), presentan un periodo promedio de gestación de 29 días y potencialmente pueden producir 12 camadas por año, tienen la capacidad de almacenar el esperma y producir, cada mes aproximadamente, una nueva generación de peces sin la intervención del macho hasta por un año. (Meffe y Snelson, 1989)

Normalmente tienen sexos separados y cada individuo mantiene el mismo sexo a lo largo de su vida. Aunque en organismos de la especie *X. helleri* se ha dicho que presentan reversión sexual de forma natural y además funcional, éste hecho ha sido ampliamente analizado y discutido por reconocidos investigadores como Kallman 1984 (Meffe y Snelson, 1989), y Lodi (1979), entre otros, mencionando que éste evento no ha sido demostrado y consideran que lo que parece una **reversión natural**, real y funcional de hembras a machos es debida a la existencia de dos tipos de machos dentro de la misma población, un tipo que es de rápida diferenciación sexual y otro de muy lenta diferenciación lo que lo hace parecer una hembra que revirtió hacia macho y que es funcional, porque además éste tipo de macho tiene una forma de cuerpo muy similar al de las hembras que son, por lo regular más grandes y anchas que los machos, en cambio los machos que se diferencian rápido son esbeltos y pequeños. (Yamamoto, 1969; Lodi, 1979 y Kallman, 1984)

Otro punto que hace dudar a algunos investigadores es la presencia de hembras arrhenoides, es decir, son hembras (jóvenes o viejas) que tienen una disfunción hormonal lo que las hace desarrollar características que las hace parecer machos, éstas NO son funcionales como machos pero, al parecer, sí como hembras. (Meffe y Snelson, 1989)

Según Milton (1983), éstos peces inician la maduración sexual a los 27 mm de longitud patrón, entre los 3 y 4 meses de edad. Presentan un cortejo caracterizado por la alternancia de nados hacia adelante y atrás del macho frente a la hembra. Meffe y Snelson (1989) mencionan que Rosen en 1960, sugiere que tal movimiento podría acentuar, en apariencia, la longitud y coloración de la espada ó que la espada acentúa los movimientos del macho, ésto con el fin de conquistar a la hembra.

Los machos adultos llegan a medir entre 60 y 80 mm de longitud total y las hembras de 80 a 100 mm (Petrovicky, 1990), alcanzando éstas últimas la madurez sexual entre los 4 y 6 meses de edad, sus primeras camadas serán de 30 a 40 crías y podrán llegar a los 60 o más. (Bailey, 1933)

Son comunes habitantes de la vertiente del Atlántico desde Veracruz, México, hasta Centroamérica. Introducido artificialmente a la cuenca del Balsas y al Valle de México. (Alvarez, 1970) (Fig. 3)

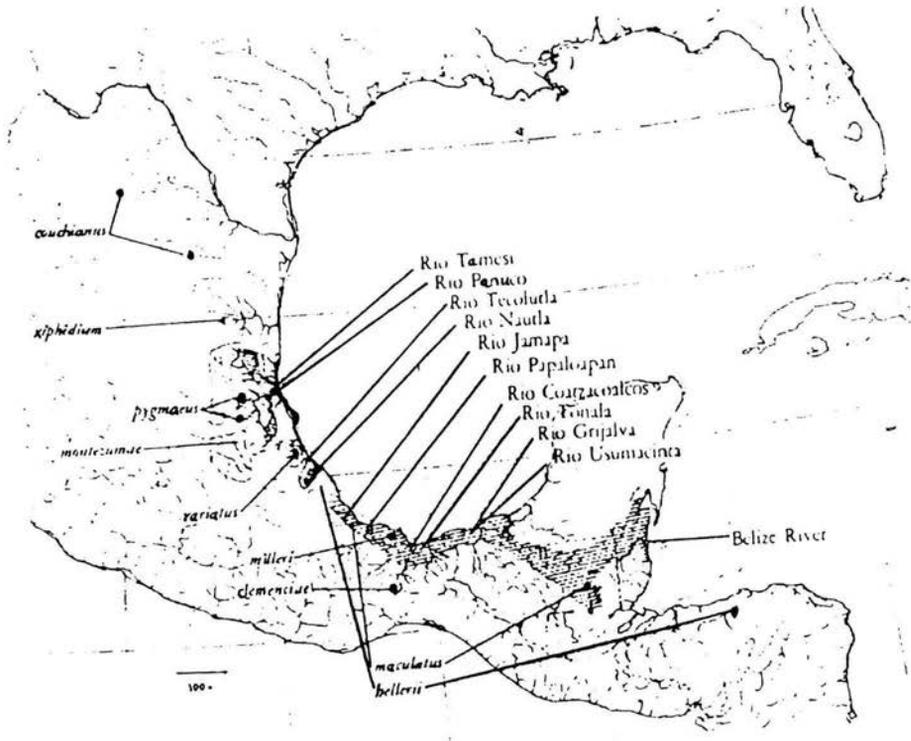


Fig. 3: Ubicación geográfica de algunas especies de *Xiphophorus* (Tomado de Kallman, 1975)

DESCRIPCION TAXONOMICA: (Según Rosen, 1960, citado en Alvarez del Villar, 1970)

- Phylum Chordata
- Subphylum Gnathostomata
- Clase Osteichthyes
- Subclase Actinopterygii
- Orden Cyprinodontiformes
- Suborden Cyprinodontoidei
- Familia Poeciliidae
- Género *Xiphophorus*
- Especie *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848)
- Nombre común Pez espada o Pez cola de espada.

ANTECEDENTES

Los poecílidos son una de las más populares familias de peces usados en investigaciones científicas que incluyen una gran variedad de disciplinas tales como reproducción y desarrollo, genética mendeliana y de poblaciones, comportamiento (Beugrand, Goulet y Payette, 1991), ecología y estudios de evolución, han sido utilizados también como controladores biológicos de plagas (Kallman, 1975), en neuroendocrinología (Golding y Pow, 1990), Toxicología (Genten y Danguy, 1990), Carcinogénesis (Anders, et al, 1990) y muchas otras.

Son de fácil manejo, se adaptan muy bien a condiciones de laboratorio y su ciclo de vida es relativamente corto. Razón por la cual son buscados por los investigadores y acuaristas, que incluso han logrado variedades híbridas de mayor colorido y vistosidad que las silvestres. Estos organismos se reproducen principalmente mediante la viviparidad y exhiben una fertilización interna.

Los efectos de los esteroides sobre la fisiología de los peces son numerosos. La administración intencional de esteroides en la dieta se inició hace ya bastante tiempo, con el fin de incrementar el crecimiento de los organismos. Posteriormente, el incremento en las dosis adicionadas a la dieta han sido usadas para inducir reversión sexual. (Yamamoto, 1969; Yamazaki, 1983).

Los poecílidos han sido utilizados en numerosos estudios cuya atención se ha centrado en los efectos causados por las hormonas esteroides sobre los caracteres morfológicos sexuales secundarios y sobre la determinación del sexo. En algunos casos los efectos de éstos tratamientos sobre el comportamiento también son mencionados. (Liley, 1969; Yamazaki, 1983)

Baldwin y Goldin, (1940) reportan que en 1937, Witschi y Crown, pusieron testosterona en el agua del acuario donde se mantenían hembras preñadas de *X. helleri* presentándose abortos y la reabsorción de embriones. Al tratar, de la misma forma a hembras adultas pero no preñadas, observaron que los ovocitos eran reabsorbidos y desarrollaron gónadas parecidas a testículos pero que no presentaban espermatogénesis; posteriormente Baldwin y Goldin mencionan que ellos administraron 0.5 mg de propionato de testosterona a jóvenes hembras de *X. helleri* durante 19 semanas, lo que no sólo provocó el desarrollo de las características sexuales secundarias de los machos, como la formación del gonopodio y la prolongación de la aleta caudal en forma de espada, si no que también se indujo la masculinización de la gónada y la degeneración de ovocitos. Estos efectos fueron simultáneos, y corroborados mediante un análisis histológico de los organismos tratados y de los control.

Cohen (1946), encontró que al tratar con pregnonolona a hembras genéticas de *X. maculatus*, se inducían las características masculinas. Estos "machos" sexo-revertidos exhibían el patrón típico de cortejo e intentos de copulación, pero de acuerdo con Tavolga (1949) el cortejo es menos vigoroso que los verdaderos machos genéticos. En cuanto a la gónada se observó, en un análisis histológico, pequeña y con pocos ovocitos, tendiendo a la degeneración y posteriormente se vió la formación de estructuras masculinas como el gonopodio, sus estructuras suspensorias y la aleta caudal en forma de espada, éstos organismos fueron más pequeños que los controles. En contraste, al tratar a los machos genéticos con benzoato de estradiol se desarrollaron como hembras y eran perseguidas por los machos normales, siendo más largos que los organismos control, su gónada se observó bipartida en lugar de fusionada como en los machos control.

Clemens y colaboradores en 1966, trataron guppys con testosterona desde el nacimiento hasta los 60 días, encontrando después del tratamiento, un marcado incremento en el número de machos con respecto a las hembras 9:1, y aunque desarrollaron las características sexuales masculinas, presentaban deficiencias en el comportamiento reproductivo de la transmisión del esperma.

Yamamoto, (1969) menciona que Essemberg en 1926, describe la diferenciación sexual de *Xiphophorus helleri* y apoyándose en ésta descripción reporta lo que según él era una completa reversión sexual espontánea, situación que no ha sido demostrada hasta la actualidad y afirma que desde 1937 cuando Berkowitz causó la formación de ovo-testis por administración de estrógenos a machos jóvenes de *Lebistes reticulatus*, se ha llevado a cabo la manipulación con hormonas naturales y sintéticas en especies como:

ESPECIE	REFERENCIA
<i>Lebistes reticulatus (Poecilia reticulata)</i>	Berkowitz (1937)
<i>Salmo irideus (Salmo gairdneri)</i>	Padoa (1937)
<i>Xiphophorus helleri</i>	Baldwin y Goldin (1940)
<i>Platypoecilus maculatus (X. maculatus)</i>	Tavolga (1949)
<i>S. trutta</i>	Ashby (1957)
<i>Carassius auratus</i>	Yamamoto y Kajishima (1968)

Liley (1969), explica que Hildemann en 1954, indujo el comportamiento de cortejo masculino en hembras platys al tratarlas con metyhtestosterona, desarrollando las características morfológicas masculinas; posteriormente cita a Laskowski 1954, quien trató a hembras inmaduras y adultas de *X. variatus* con testosterona, ambas desarrollaron el gonopodio y la espada pero tenían ciertas fallas en el cortejo reproductivo y concluye que, en general, los estrógenos pueden **suprimir** el desarrollo del testículo y de las características sexuales secundarias en el desarrollo de los machos genéticos. En cambio los andrógenos **promueven** la formación de estructuras masculinas, en las hembras genéticas, aprovechando la potencialidad que tienen las células de desarrollar dichas estructuras.

Nakamura y Takahashi (1973), trataron tilapias de 5 a 10 días de nacidas administrándoles 50 mg/g de etinilestradiol en el alimento por diversos periodos de tiempo, obteniendo una completa feminización en el grupo que fué tratado de 6 a 25 días cubriendo completamente el período de definición de la gónada, por lo que no se presentó ningún macho en éste grupo.

Guerrero (1975), fué el primero en utilizar andrógenos sintéticos para lograr reversión sexual en crías de *T. aurea*, empleando ethyniltestosterona y metyltestosterona a 15, 30 y 60 mg/Kg de dieta por 18 días. Con ethyniltestosterona a 60 y 30 mg/Kg produjeron 100 y 98% de machos respectivamente. Con metyltestosterona a 30 mg/Kg también obtuvo un 98% de machos. Sin embargo éste esteroide fué menos efectivo a 60 y 15 mg produciendo 85 y 84% de machos respectivamente. Los tratamientos no afectaron el crecimiento o la sobrevivencia.

Takahashi (1975a), probó con machos genéticos de *P. reticulata* dos hormonas mezcladas con el alimento: Etinilestradiol a 125 y 150 mg/g y Dienestrol a 100 mg/g, la primera por 30 días y la segunda por 40. Encontró que etinilestradiol a 125 mg/g fué completamente efectiva causando una completa feminización, para el caso de dienestrol no se logró la feminización completa y por el contrario se observaron machos más largos que lo normal. Finalmente observó que la primera hormona a 150 mg/g sí producía feminización pero con ciertas malformaciones por lo que considera que la dosis fué excesiva.

Hopkins (1979), por su parte administró oralmente Diethylestilbestrol a crías de 12 mm de longitud total. Las concentraciones que utilizó fueron de 25 a 200 mg/kg de alimento con duración de 35 a 56 días. Obteniéndolo un máximo del 64% de hembras (*T. aurea*) con 100 mg/kg durante 8 semanas, finalmente él recomienda probar ésta hormona adicionada con Metaliburo que es un agente bloqueador de la pituitaria, lo que quizá eleve los porcentajes de hembras a obtener y que el tratamiento dure 6 semanas para que sea efectivo y no dañe las gónadas.

Yamazaki, (1983) menciona que Takahashi en 1975b trabajó con hembras grávidas de *P. reticulata*, administrándoles metyltestosterona en el alimento a una concentración de 400 mg/Kg de alimento, con duración de 8 a 10 días antes del nacimiento y al nacer las crías fueron alimentadas con una dieta normal. El afirma que éste tratamiento indirecto fué mucho más efectivo que el que aplicó directamente a los peces de su trabajo anterior, logrando una reversión sexual funcional; también comenta que Tayamen y Shelton en 1978, trabajaron con peces recién nacidos de *S. niloticus* administrándoles oralmente Diethylestilbestrol a 25 y 100 mg/kg de alimento durante 25, 35 y 59 días. Logrando una producción de entre el 62 y 90 % de hembras, notando que al comparar con el trabajo de Hopkins que trató a *T. aurea*, la inversión sexual fué más efectiva en *S. niloticus*.

Hunter y Donaldson (1983), comentan que en salmónidos la inversión sexual orientada para producir hembras ha sido llevada a cabo desde 1937 cuando Padoa utilizó juveniles de *Salmo irideus* en inmersiones con estrona y concluye que los tratamientos en trucha deben iniciarse justo después de la absorción del saco vitelino y al recibir su primer alimento, si se inicia posterior a éste periodo el tratamiento es inefectivo. Posteriormente vieron que al tratar los huevos oculados en inmersiones con estrógenos el porcentaje de hembras obtenidas se elevaba aún más; también resaltan que los primeros investigadores en utilizar estrógenos sintéticos fueron Eckstein y Spira en 1965, quienes trataron de esterilizar a peces de *T. aurea* con el propósito de cultivo. Aplicaron los estrógenos en el agua de 50-1000 mg/l durante 5-6 semanas, entre los estrógenos que utilizaron se encontraba la Diethylestilbestrol, que junto con las demás hormonas a dosis superiores a 200 mg/l producían altas mortalidades. A 50 y 100 mg/l se presentaba inhibición de la gonadogénesis, resultando en la mayoría de los casos una completa esterilidad logrando así su objetivo. Mencionan también que Bardach y colaboradores en 1972, apoyaron la producción de poblaciones monosexo, sólo hembras, con el fin de disminuir una actividad destructiva como lo es la construcción de nidos por parte de los machos. Afirmando que el cultivo monosexo de machos, cuando éstos son territorialistas, tiene la desventaja de que aumenta el stress y por lo tanto aumenta la mortalidad ocasionando pérdidas al productor. (Basavaraja, 1990). Elijiendo así el cultivo de hembras.

Sower (1984), y colaboradores trabajaron con alevines de *Salmo salar* que fueron tratados con Diethylestilbestrol a 10, 1.0 y 0.1 mg/kg de alimento por 60 días, iniciando justo después de la absorción del saco vitelino, encontrando que a las dosis probadas no se obtuvo un gran porcentaje de hembras, con 0.1 y 1.0 mg/kg lograron el 45 y 48 % respectivamente, con 10 mg/kg sólo obtuvieron el 43% de hembras y del 5 al 17% de los peces fueron intersexuales. Estos datos deben ser tomados con cuidado pues en éste estudio se probaron además de la hormona otros factores que seguramente influyeron en tan bajos resultados.

Kramer y Kallman (1985), trabajaron con *X. helleri* para saber si es posible determinar físicamente el sexo en estadios tempranos del desarrollo y encontraron que a partir de la etapa 18 del desarrollo embrionario (Según Tavolga, 1949 a los 8.4 días), es posible reconocer un dimorfismo sexual basado en ciertos rasgos somáticos de la gónada.

Basavaraja (1990), alimentó a peces de 8 a 10 mm de longitud total de tilapia con 25, 50 y 100 ppm de Diethylestilbestrol por 30 días. Logró un 100% de feminización con 50 y 100 ppm, y con 25 ppm obtuvo un ligero aumento de hembras respecto al grupo control. No observó intersexuales o estériles ni efectos nocivos en las dosis altas.

Kavumpurath y Pandian (1993), trabajaron con hembras grávidas de *P. reticulata* administrándoles en el alimento andrógenos sintéticos o naturales por un periodo de 5 a 24 días antes del nacimiento de las crías. Las poblaciones de sólo machos fueron obtenidas con androsterona, 19-nor-etinilttestosterona y 17 α -etinilttestosterona a dosis de 200, 300 y 500 mg/Kg de alimento respectivamente. La 9(11)-dimetiltestosterona produjo una incopleta reversión y a altas dosis (400 mg/Kg de alimento) se incrementaba la mortalidad. Encontraron que la androsterona fué la hormona más potente para producir la reversión sexual con la máxima sobrevivencia y además funcionalidad.

Las observaciones hechas sobre especies de poecílicos sugieren que son organismos que se pueden tratar hormonalmente para obtener reversión sexual durante la embriogénesis (tratando a las hembras preñadas), después del nacimiento e incluso después de la maduración sexual logrando resultados satisfactorios empleando diversas técnicas, dosis y esteroides.

Actualmente se ha trabajado con 47 especies de peces (15 familias gonocóricos y 34 especies; 9 familias hermafroditas) usando uno de 31 (16 andrógenos y 15 estrógenos) esteroides para obtener poblaciones monosexo masculinas, poblaciones monosexo femeninas o poblaciones estériles. (Pandian y Sheela, 1995)

Por lo anteriormente expuesto, para el presente estudio se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVOS :

- Conocer la dosis óptima de Diethylstilbestrol para obtener una población monosexo (Hembras).

- Describir los efectos causados por la hormona sobre la proporción sexual en organismos de la F2 de *X. helleri*.

- Describir los efectos morfológicos, externos y en gónada, causados por la hormona en los organismos.

METODOLOGIA

COLECTA Y ACONDICIONAMIENTO DE ORGANISMOS

Los peces de la especie *Xiphophorus helleri* se obtuvieron en el río Las Estacas que se localiza en el estado de Morelos, México, en los 18° 43' 48" de latitud Norte y 99° 06' 40" de longitud Oeste, el 24 de febrero de 1992. (Fig. 4)

Los organismos se colectaron con un chinchorro playero de 10 mts. de longitud y luz de malla de 0.5 pulgadas. Fueron transportados en tinas de plástico de 70x40x30 cms con 80 litros de agua aproximadamente, con suministro constante de oxígeno por medio de una bomba aireadora portátil.

Se llevaron al laboratorio de metodología científica V (L-521) de la UNAM, Campus Iztacala donde se acondicionaron a la vida de laboratorio colocándolos en un acuario de vidrio de 250 litros con una temperatura promedio de 25°C ± 2 mediante termostatos de 100 watts; un pH de 7.6, aireación constante mediante bombas; el suministro de agua se tomó de la red de agua municipal, previamente declarada por reposo durante 24 hrs.

Una vez en el laboratorio se identificaron las diferentes especies mediante las claves de peces de Alvarez del Villar (1970), encontrándose 23 hembras y 18 machos además de otras especies acompañantes que fueron desechadas.

Ya con los organismos identificados, se sacrificaron los parasitados ó enfermos quedando, en el mismo acuario, 18 hembras y 15 machos para permitir que se llevara a cabo la copulación; se alimentaron en días intercalados con alimento seco para trucha-desarrollo Purina (ver APENDICE I) ad libitum, y alimento vivo (*Artemia sp.*, *Tubifex sp.*), de una a dos veces al día, sifoneando los restos y desechos cada tercer día.

OBTENCION DE LA GENERACION F1

Al observarse hembras grávidas (ésto es cuando la región de la cavidad abdominal se presenta muy abultada y de color oscuro), se les separó en otro acuario donde se les colocó en maternidades de red o de plástico para permitir el nacimiento de las crías y evitar el canibalismo por parte de los demás peces, ésto se continuó haciendo cada vez que había hembras grávidas para continuar obteniendo organismos de primera generación ó F1 sin que se mezclaran los diferentes grupos de edades.

Al día siguiente del nacimiento de las crías (Generación F1), cuando han digerido su saco vitelino, se les comenzó a dar alimento preparado de la siguiente forma:

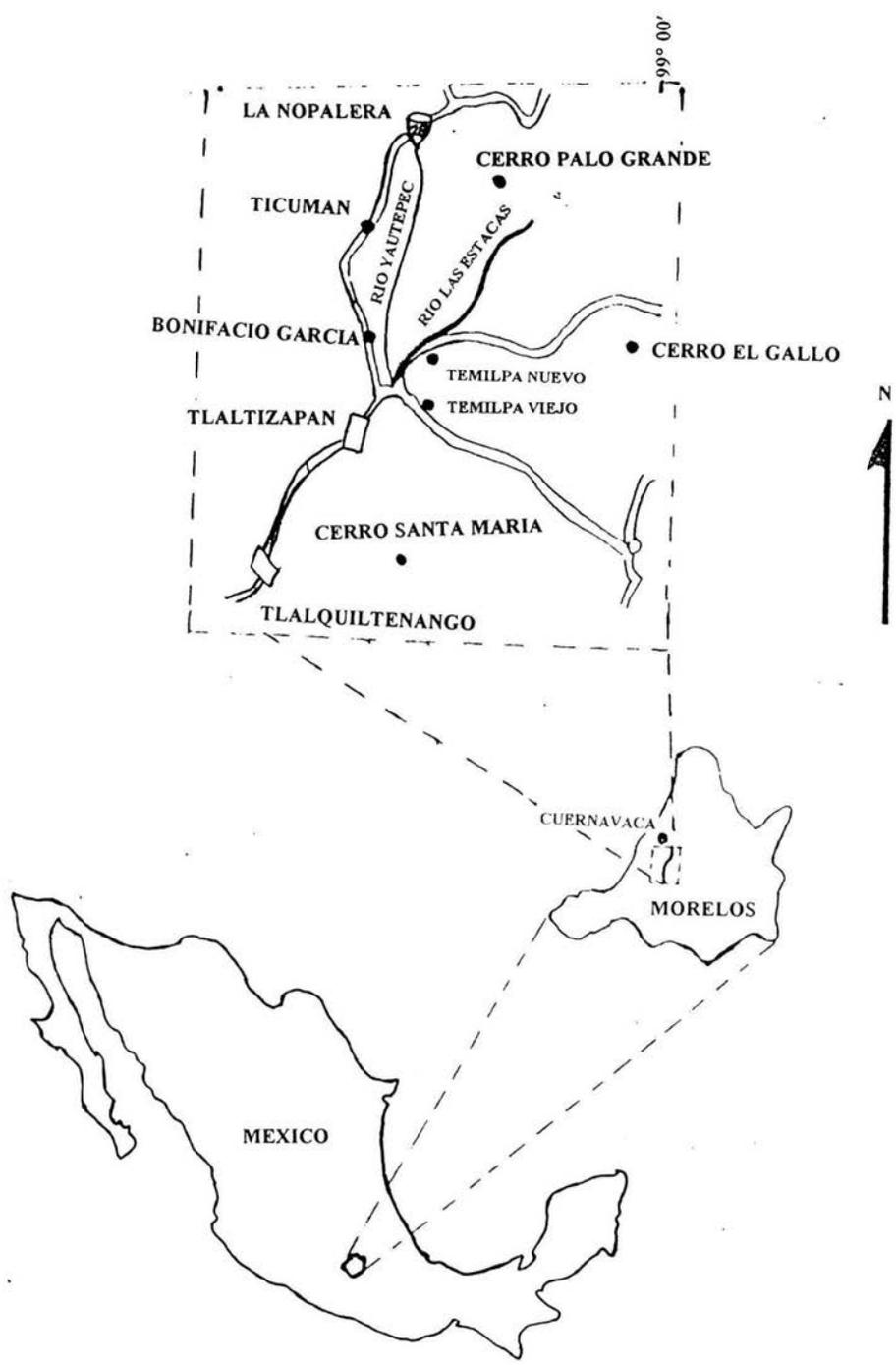


Fig. 4: Ubicación geográfica del río Las Estacas, lugar de colecta de *Xiphophorus helleri*.

El alimento seco Purina se trituró con mortero y se pasó por un tamiz del número 50 con abertura de 0.297 mm y un área abierta del 33.3%, se guardó en botes opacos de plástico con tapa y se mantuvieron a temperatura ambiente. Este molido se hizo con el fin de que el alimento pudiera ser tomado por las crías que son de una talla pequeña, se administró ad libitum.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para determinar las condiciones a emplear en el estudio fué necesario primero hacer un Bioensayo.

BIOENSAYO

Las condiciones a determinar en ésta parte fueron:

Las dosis de hormona a utilizar, el número óptimo de organismos a colocar por pecera, dado que para éstos organismos sólo se reportan densidades para acuarios de exhibición y no de producción, y el tiempo de duración de los tratamientos. También se hicieron observaciones sobre el periodo de gestación de los organismos de acuerdo a las condiciones de laboratorio impuestas, así como el número de crías que puede tener una hembra y por último ver el comportamiento tanto reproductivo como de convivencia de las hembras grávidas.

Las crías de *X. helleri* nacidas en el laboratorio (F1) fueron mantenidas en el acuario donde nacieron hasta los 4 meses y a partir de entonces se separaron por sexo mediante la observación de caracteres sexuales como la presencia de gonopodio y el desarrollo de la aleta caudal en forma de espada con aumento de pigmento en los machos y en las hembras ausencia de tales características.

Cuando los organismos cumplieron 6 meses se tomaron al azar 5 grupos de 16 hembras y 32 machos (proporción 1:2), se colocó cada grupo en acuarios de vidrio de 54 litros (30x60x30 cms.) con filtro de caja, aireación constante y termostato ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$), además se instaló un Timer para mantener un fotoperiodo de 12HL:12HO. Estos peces se mantuvieron juntos por 48 hrs. para permitir que se llevara a cabo la copulación. Una vez pasado éste tiempo se extrajeron los machos quedando únicamente las hembras a las que se les continuó alimentando normalmente durante 10 días, período en que ocurre la fecundación ya que Hopper, (1943) habla de la existencia de un periodo o intervalo de 7 días, a partir del contacto de la hembra con el macho, para asegurar la fecundación de los huevos.

A partir del 11° día se procedió a administrar el alimento hormonado, una vez al día *ad libitum*, como generalmente se acostumbra en éste tipo de estudios, hasta el nacimiento de las crías (generación F2) y durante un mes más, dado que la hormona es insoluble en agua, el alimento se dejaba para que los organismos lo consumieran a lo largo del día y los restos eran sifoneados cada tercer día.

En cuánto a la concentración de hormona tomamos como base las dosis usadas para otros organismos, como tilapia (Basavaraja, 1990) haciendo la conversión por talla de organismos, por lo que se decidió utilizar 25, 18.75, 12.5, 6.25 y 0.0 mg/Kg de alimento.

Al cumplir un mes de nacidos los organismos F2 se les dejó de dar el alimento hormonado y se les comenzó a dar alimento sin tratar únicamente molido hasta los 4 meses de edad, a partir de ésta fecha se sexaron y contaron los organismos obtenidos por tratamiento. Respecto a las hembras F1 se hicieron observaciones de comportamiento de convivencia y para saber si consumían el alimento hormonado, que efectos les producía sobre la morfología general del cuerpo.

Este procedimiento sólo se hizo una vez sin repeticiones. A lo largo del experimento se hicieron observaciones de comportamiento para saber si los organismos se estresaban por la densidad de peces en el acuario, esto se hacía observando continuamente a las hembras para saber si se perseguían unas a otras provocando que algunas saltaran del acuario, hasta que finalmente las persecuciones disminuyeron y por lo tanto dejaban de saltar fuera del acuario.

ESTUDIO

De los organismos de la F1 de 6 meses de edad se tomó un grupo de 40 hembras y 80 machos los cuales se repartieron entre 5 acuarios (es decir 8 hembras y 16 machos) que contaban con las condiciones ambientales ya mencionadas para el bioensayo.

Para ésta parte del estudio, se cambiaron las dosis a 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, y 0,0 mg/Kg, porque los resultados del bioensayo nos dieron la pauta a seguir en ésta parte del estudio, se decidió reducir las dosis a utilizar partiendo de las ya conocidas, reducir también el tiempo de administración para que abarque únicamente el desarrollo embrionario y saber si la hormona resulta menos tóxica y más efectiva para obtener un mayor número de organismos que principalmente sean hembras y además tener un ahorro en la cantidad de hormona a emplear en éste tipo de procesos.

Al nacer las crías (F2) se separaron de las madres, se anotó la fecha de nacimiento, y una vez que absorbieron el saco vitelino, se les dió alimento normal (sin tratar), hasta el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios aproximadamente a los 4 meses de edad tomándose, como características observables a simple vista, para machos la presencia de gonopodio ya formado ó en formación así como el desarrollo de pigmentos en la aleta caudal y la elongación de la misma; para las hembras una aleta anal con sus radios sin ninguna modificación al igual que la aleta caudal.

En ésta etapa se contaron los individuos (F2) de cada sexo por tratamiento, después se tomaron al azar 4 organismos de cada dosis (2 hembras y 2 machos) para observación de la gónada en microscopio estereoscópico. Esto también se hizo con las madres (F1), después de 20 días de recuperación, tomándose 2 organismos al azar de cada dosis.

Con los organismos restantes F2 se hizo una prueba de fecundidad colocando en acuarios aparte 2 hembras hormonadas con 4 machos sin tratar y en otros 4 machos hormonados con 2 hembras sin tratar, se dejaron juntos durante 48 hrs. y se esperó a que hubiera en caso de que fueran fértiles desarrollo de embriones y posterior nacimiento de nuevas crías (F3).

Este procedimiento se realizó por triplicado, con hembras F1 nuevas para cada repetición.

Los resultados fueron analizados por medio de una Chi cuadrada, ($P < 0.05$), para las proporciones sexuales, siendo los resultados obtenidos de los grupos hormonados los observados y los del grupo control los esperados. Se utilizó el paquete estadístico SPSS/PC+. (Ver APENDICE II)

Para conocer la efectividad de cada dosis de hormona, se calcularon los porcentajes logrados en cada tratamiento, entendiéndose como efectividad a que cumple con la finalidad propuesta, o sea aumento en el número de hembras y disminución de machos.

Se utilizó el estadístico de Kruskal-Wallis para determinar diferencias estadísticas, respecto al tiempo de gestación de todos los grupos, ($P < 0.05$). Además se obtuvieron las medianas por tratamiento y su desviación.

PREPARACION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

Para la preparación de las dietas se utilizó el alimento mencionado y preparado de la misma forma, al cual se le agregó la hormona Diethylestilbestrol de la marca Sigma Chemical Co. con número de catalogo D-4628 y lote 22H0690, cuya fórmula condensada es $C_{18}H_{20}O_2$, y con peso fórmula de 268.4.

Para hormonar el alimento se empleó el método de evaporación de alcohol de Guerrero (1975); obteniendo cuatro dietas experimentales y una control (tratada únicamente con alcohol) siendo:

DIETA 1.- 5.0 mg de hormona/kg de alimento.

DIETA 2.- 7.5 mg de hormona/kg de alimento.

DIETA 3.- 10.0 mg de hormona/kg de alimento.

DIETA 4.- 12.5 mg de hormona/kg de alimento.

DIETA 5.- 0.0 mg de hormona/kg de alimento.(CONTROL)

Una vez preparado y seco el alimento se guardó en botes opacos de plástico con tapa y a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSION

BIOENSAYO

CONDICIONES PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL ESTUDIO

Hablando específicamente de las condiciones necesarias para el establecimiento del estudio encontramos que podíamos mantener 8 hembras por acuario de 54 litros como número óptimo de organismos, es decir un organismo por cada 7 litros de agua aproximadamente y 16 machos sólo durante 48 horas para permitir que halla copulación (Comúnmente se acostumbra poner 2 machos por cada hembra). Cuando colocábamos 16 hembras con 32 machos, los organismos saltaban de los acuarios aún cuando ya se habían sacado los machos, presentándose muy nerviosas al darles el alimento no lo comían sino hasta después de un tiempo en que se tranquilizaban, se salían de las maternidades y se lastimaban.

PERIODO DE GESTACION

Respecto al periodo de gestación de las hembras hormonadas se pensaba que se veía afectado, ya sea de manera favorable o perjudicial, prolongándose ó acelerándose, pero como ya lo mencionaban Tavalga (1949) y Bailey (1933) los resultados encontrados se hallan dentro de lo normal ya que se encontró que los intervalos de gestación en promedio fueron de 53.6 días para los organismos control y de 49 días para los hormonados que dieron descendencia.

NUMERO DE CRIAS F2

Respecto a el número de crías que es capaz de tener una hembra vemos que se confirman los datos de Bailey (op. cit.), encontramos primeras camadas de las hembras del grupo control de 30 a 40 crías y conforme pasa el tiempo de 94 o más, por lo que se encuentran dentro de lo normal, no así las hembras hormonadas, que como se aprecia en la Tabla No. 1 el número de crías disminuye drásticamente.

COMPORTAMIENTO

Observamos que el comportamiento reproductivo de los organismos, se presenta con jerarquías tanto para hembras como para machos, notándose siempre una hembra y un macho dominante, éste presenta un cortejo reproductivo como el descrito por Rosen en 1960, (Meffe y Snelson, 1989), él mantiene a toda la población de machos en las esquinas del acuario alejados de las hembras como lo mencionan Beaugrand, Caron y Comeau (1984).

La mortalidad en el laboratorio por causas del manejo fué del 15% en general y debida al tratamiento del 100% con las dosis 25 y 18.75 mg/Kg y 0% para 12.5 y 6.25 mg/Kg.

EFFECTOS CAUSADOS POR LA DIETHYLETILBESTROL SOBRE LA MORFOLOGIA CORPORAL DE LAS HEMBRAS F1.

Al final de los tratamientos se observó lo siguiente:

DOSIS (mg/Kg)	EFECTOS CAUSADOS POR LA HORMONA SOBRE LA MORFOLOGIA CORPORAL DE LAS HEMBRAS F1	DESCENDENCIA		TOTAL
		H	M	
0.00	Ninguno, la forma del cuerpo es fusiforme, la región abdominal es redondeada, el color de la piel es grisáceo con destellos de colores y algunas manchas anaranjadas y negras en los costados.	85	10	95
6.25	Ninguno, la forma y color fueron, aparentemente, iguales que los organismos control.	20	0	20
12.50	Ninguno, la forma y color fueron, aparentemente, iguales que los organismos control.	15	2	17
18.75	Organismos muy delgados, la región abdominal está aplanada, el cuerpo color blanco sin reflejos ni manchas, la base de las aletas anal, pélvicas y torácicas de color amarillo.	0	0	0
25.00	Organismos muy delgados, la región abdominal está aplanada, el cuerpo color blanco sin reflejos ni manchas, la base de las aletas anal, pélvicas y torácicas de color amarillo.	0	0	0

Tabla No. 1.- Resultados observados sobre las hembras F1 al final del Bioensayo.

Como se observa en la tabla anterior, las altas dosis de hormona (25 y 18.75 mg/Kg) no permitieron que hubiera descendencia y además provocaron la muerte de las hembras progenitoras después de causarles varios trastornos corporales, razón por la cual se decidió bajar las dosis y el tiempo de administración. Situación parecida a la que se les presentó a George y Pandian (1995) quienes al tratar a las hembras preñadas con diethylestilbestrol observaron que abortaban su progenie por lo que ellos decidieron tratar a los peces recién nacidos con la hormona en lugar de las hembras preñadas. Por lo tanto, se considera, que tales dosis resultan tóxicas como lo mencionan Goetz (1979), Sower (1984) y colaboradores, ellos observaron que las hormonas a dosis elevadas afectan directamente a la gónada, pero también a otros órganos como hígado y riñones lo que ocasiona que las hembras reabsorban los huevos, adelgacen y finalmente mueran, aunque el mecanismo mediante el cual los estrógenos inducen la muerte del organismo es aún desconocido. (Sower, et. al., op. cit.)

Con las dosis de 12.5 y 6.25 mg/Kg, se obtenía el efecto feminizador buscado pero no se obtuvieron muchos organismos tal vez debido a que el tiempo de administración fué excesivo (Sower, et al, op. cit.), razón por la cuál se decidió volver a probar a 12.5 mg/Kg y a partir de ahí determinar las nuevas dosis a probar pero sólo durante el desarrollo embrionario.

ESTUDIO

PROPORCION SEXUAL DE LOS ORGANISMOS F2

Una vez que los organismos llegaron a la madurez, se sexaron bajo el microscopio estereoscópico, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

DOSIS (mg/Kg)	No. DE H			No. DE M			PROMEDIO		%	
	1a	2a	3a	1a	2a	3a	H	M	H	M
0.0	87	14	19	61	5	0	40.0	22.0	64.5	35.5
5.0	14	3	15	5	0	6	10.7	3.7	74.3	25.7
7.5	28	4	22	4	2	8	18.0	4.7	79.3	20.7
10.0	44	14	11	2	9	2	23.0	4.3	84.3	15.7
12.5	0	24	7	2	3	4	10.3	3.0	77.4	22.6

Tabla No. 2.- Número de hembras y machos obtenidos para cada dosis de hormona, en las 3 repeticiones.

De acuerdo a la tabla No. 2 podemos ver claramente que el número de hembras siempre es mayor con respecto al de machos, si observamos los promedios y si comparamos los resultados del grupo control con los hormonados es claro notar que tanto las hembras como los machos son, en cantidad siempre mas numerosos que los hormonados (hembras 40 y machos 22) (Gráfica No. 1), ésto quizá se deba a que su desarrollo embrionario no se vió afectado por ningún evento como ocurre en el caso de los hormonados (administración de hormona sintética); pero si comparamos los resultados de la última columna y la gráfica No. 2 vemos que la situación cambia siendo los datos del grupo control los mas bajos para hembras (64.5%) y los mas altos para machos (35.5%), y para el grupo que fué tratado con 10.0 mg/Kg de hormona encontramos los más altos para hembras (84.3%) y más bajos para machos (15.7%). Esto se explica por que el esteroide administrado actúa vía la pituitaria de los embriones, causando una liberación temprana de gonadotropinas que determinan el sexo del futuro pez. (Schreibman, Berkowitz y van den Hurk, 1982; Chan y Yeung, 1983). Y, como la diethylestilbestrol actúa como estrógeno, provoca que la pituitaria libere gonadotropinas femeninas y que por lo tanto haya más hembras que machos.

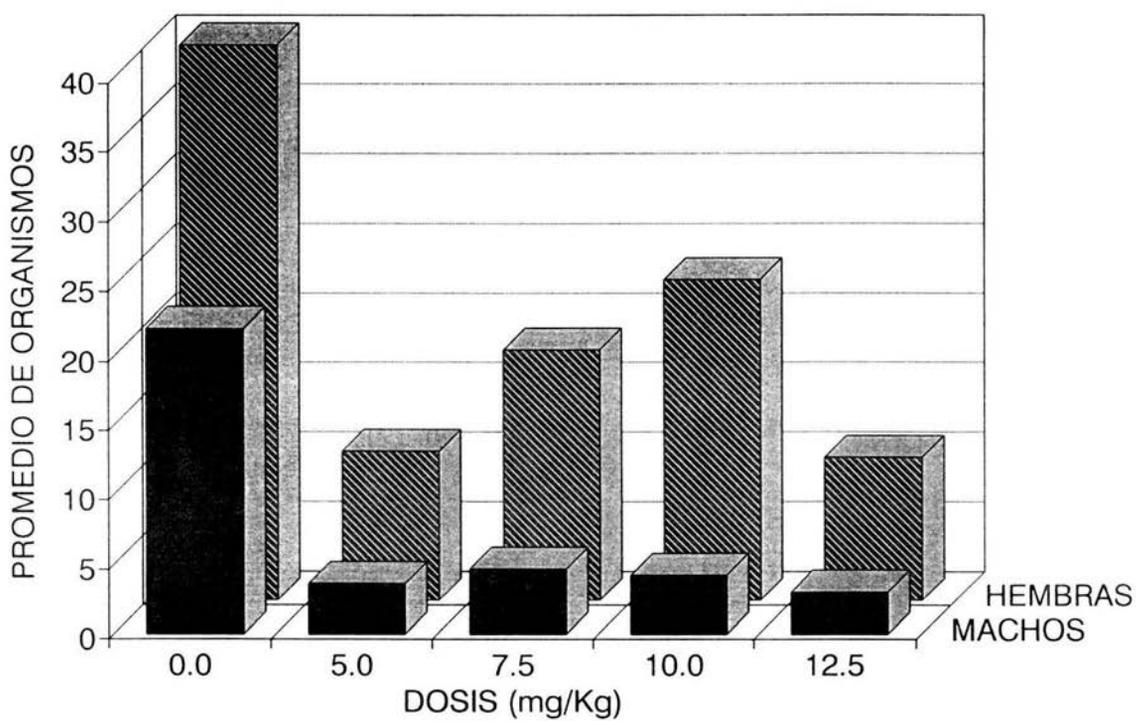
Con éstos resultados se procedió a hacer la prueba Chi cuadrada con la que estadísticamente se comprobó que los tratamientos fueron significativamente diferentes ($P \geq 0.05$), con respecto al número de organismos obtenidos por sexo contra el control. Encontrándose una mayor diferencia entre las dosis de 10.0 y 7.5 mg/Kg y menor para 12.5 y 5.0 mg/Kg respecto al grupo control.

Esto quiere decir que, para las dosis 10.0 y 7.5 mg/Kg la diferencia es significativa con respecto al grupo control, no así para 12.5 y 5.0 mg/Kg, ésto no quiere decir que no hubo cierto efecto feminizador en éstos dos grupos, que por ser mínimo no fué posible detectarlo. Hunter y Donaldson (1983) mencionan que Sanico en 1975 trató a organismos de *Oreochromis aureus* con estrona obteniendo una proporción sexual no significativamente diferente y dos años después Liu (1977) reportó que uno de éstos peces produjo una descendencia 100% masculina, indicando que la reversion del sexo se había llevado a cabo completamente en ese organismo. En la siguiente tabla, se muestran el total de organismos obtenidos para cada dosis de hormona y para el grupo control.

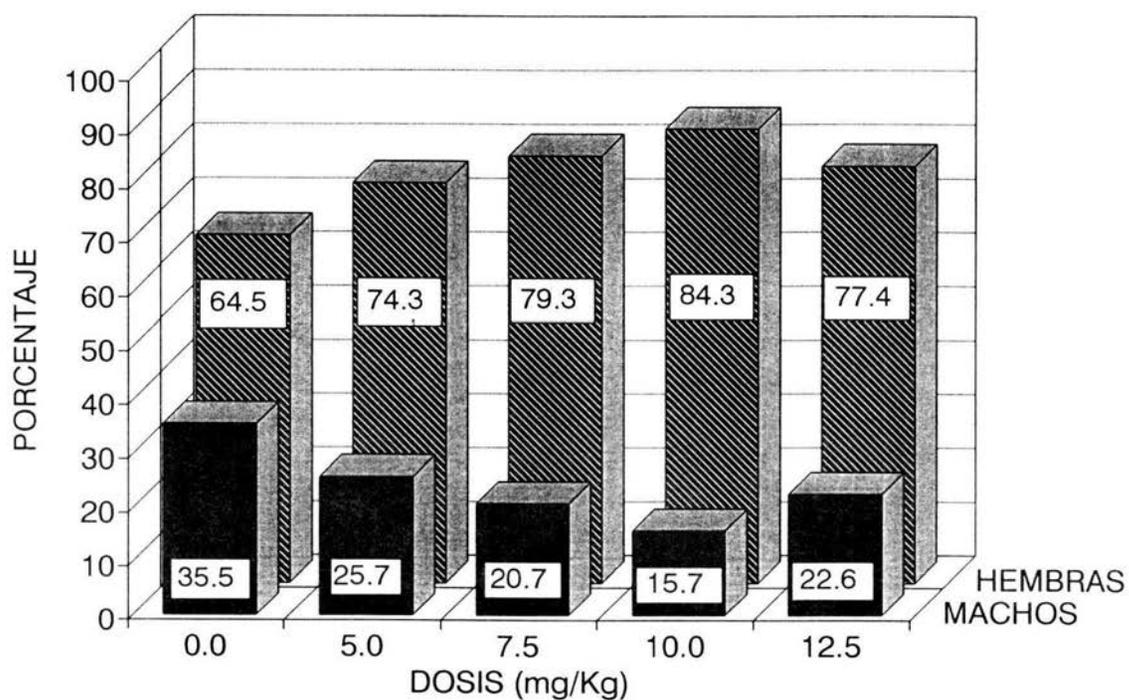
DOSIS (mg/Kg)	No. DE HEMBRAS	No. DE MACHOS	RELACION H : M
0.0	120	66	1.8 : 1
5.0	32	11	2.9 : 1
7.5	54	14	3.8 : 1
10.0	69	13	5.3 : 1
12.5	31	9	3.4 : 1

Tabla No. 3.- Proporción final de Hembras y Machos obtenida con los datos de las tres repeticiones para cada tratamiento. (Hormonados y Control)

GRAFICA No. 1
NUMERO PROMEDIO DE ORGANISMOS Vs DOSIS



GRAFICA No. 2
PORCENTAJE Vs DOSIS



Es evidente que la proporción sexual, en términos generales, se ve favorecida hacia las hembras (Tabla No. 3), en el grupo que se trató con una dosis de 10.0 mg/Kg la relación HEMBRAS:MACHOS fué de 5.3:1, disminuyendo en comparación con 7.5 mg/Kg que es de 3.8:1, en 12.5 fué de 3.4:1, para 5.0 fué de 2.9:1 y en el grupo control de 1.8:1, como se observa en la gráfica No. 3.

EFFECTIVIDAD DE LA DIETHYLETILBESTROL

De acuerdo a la tabla anterior y a los porcentajes obtenidos se muestra la efectividad de las dosis administradas:

DOSIS (mg/Kg)	% DE HEMBRAS	% DE MACHOS
0.0	64.5	35.5
5.0 iv	74.3	25.7
7.5 ii	79.3	20.7
10.0 i	84.3	15.7
12.5 iii	77.4	22.6

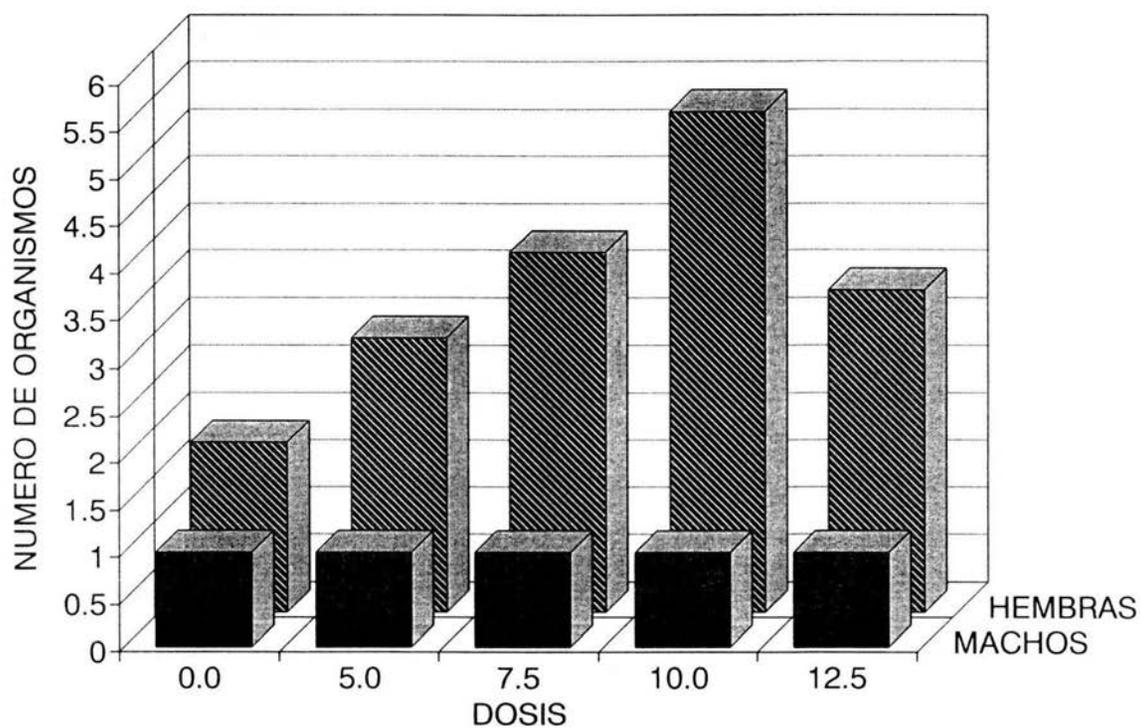
EFFECTIVIDAD: i > ii > iii > iv .

Tabla No. 4.- Valores encontrados en cuanto a efectividad de la dosis de hormona. Observándose que $10.0 > 7.5 > 12.5 > 5.0$ mg/Kg.

Por lo anterior podemos decir que para éste estudio la dosis óptima no se obtuvo ya que se esperaba un 100% de hembras y por lo tanto sólo hablamos de que la dosis con más alto porcentaje de hembras fué 10.0 mg/Kg con 84.3% (Tabla No. 4), siendo ya un porcentaje similar al reportado por Tayamen y Shelton (1978) quienes obtuvieron del 73 al 90% de hembras de Tilapia recién nacidas al ser tratadas con 25 mg/Kg de Diethyletilbestrol.

Hopkins en 1979, sólo obtuvo un 64% de hembras de tilapias de 12mm al tratarlas con 100 mg/Kg diethyletilbestrol durante 8 semanas, mientras que Basavaraja y colaboradores (1990), lograron un 100% al tratar a Tilapias de 8 a 10 mm de longitud total con 50 y 100 ppm de Diethyletilbestrol en el alimento durante 30 días, siendo éste el reporte más exitoso, lo cual indica que cubrió perfectamente el periodo de diferenciación sexual de la gónada hecho que los demás autores no hicieron, y aunque nosotros en el bioensayo logramos un grupo 100% monosexo al emplear la dosis de 6.25 mg/Kg administrada durante el desarrollo embrionario y un mes más, dado que no se hicieron repeticiones no podemos decir que esas son las condiciones que debemos emplear para obtener poblaciones monosexo y los resultados pueden variar, pero si podemos presumir que el periodo de diferenciación sexual se cubrió completamente como lo hicieron Basavaraja y sus colaboradores.

GRAFICA No. 3: ORGANISMOS Vs DOSIS
PROPORCION SEXUAL HEMBRAS:MACHOS



Por otro lado podemos ver que, en nuestro trabajo se obtuvo un gradiente discontinuo de efectividad en cuanto a las dosis administradas debido a que la dosis de 12.5 mg/Kg resulta tóxica y la de 5.0 mg/Kg es tan baja que su efecto es mínimo, siendo:

DOSIS DE DIETHYLETILBESTROL EN mg/Kg

$$10.0 > 7.5 > 12.5 > 5.0 > 0.0$$

$$+ \leftarrow \text{-----} \rightarrow -$$

EFFECTIVIDAD

PERIODO DE GESTACION (F2)

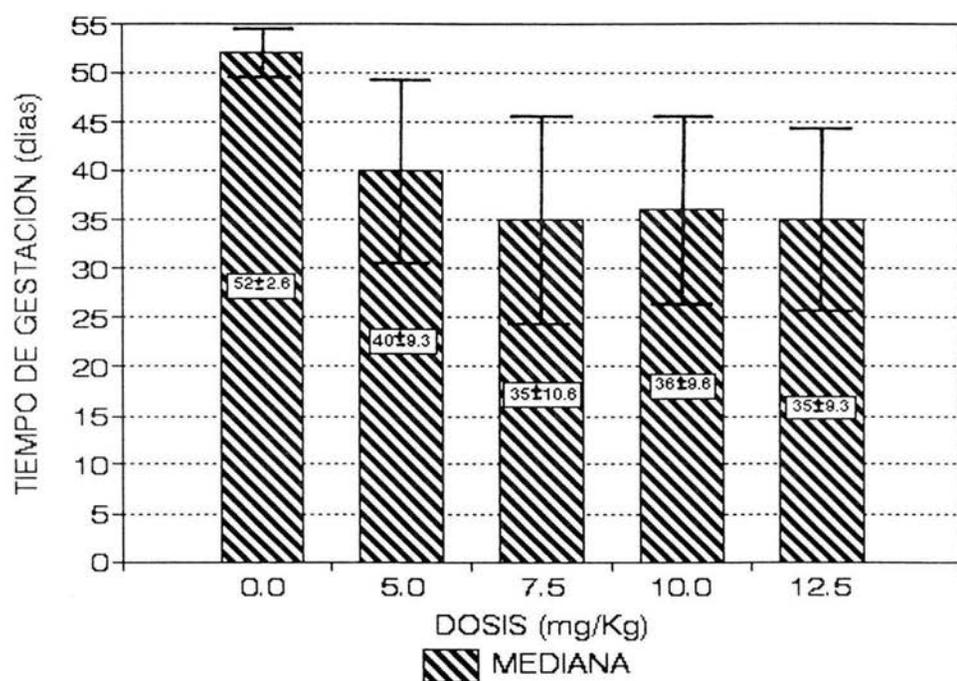
El tiempo transcurrido desde el contacto de la hembra con el macho, hasta que nacen las crías se observa de la siguiente manera:

DOSIS (mg/Kg)	PERIODO PROMEDIO DE GESTACION EN DIAS
12.5	37.00
10.0	37.66
7.5	37.66
5.0	41.33
0.0	50.00

Tabla No. 5.- Tiempos promedio de gestación de embriones que se encontraron durante el experimento.

Al comparar los datos de la tabla No. 5 con los reportados por Tavolga (1949), quien menciona que para éstos organismos existen intervalos de gestación que van de 27 a 43 días, Bailey (1933) reporta intervalos en promedio de 30 días y por nosotros (resultados obtenidos en el bioensayo de 53.6 días), notamos que realmente se hallan entre lo reportado por los autores y lo que nosotros encontramos, debido a las semejantes condiciones ambientales en que son mantenidos, (para los organismos del bioensayo y de éste estudio) y al realizar la comparación de los diferentes tratamientos no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0.05$). Y ésto se observa en la gráfica no 4 donde se aprecian las medianas y sus desviaciones para cada grupo. Por lo tanto podemos decir que el tiempo de gestación no se ve alterado incluso aún cuando han recibido la hormona.

GRAFICA No. 4
TIEMPO DE GESTACION Vs. DOSIS



EFECTOS MORFOLOGICOS CAUSADOS POR LA DIETHYLETILBESTROL SOBRE LOS ORGANISMOS TRATADOS

Una vez nacidas las crías, se dejó reposar durante 20 días a las hembras (F1) para hacer observaciones de gónada, encontrando lo siguiente:

DOSIS (mg/Kg)	EFECTOS OBSERVADOS EN GONADA	TAMAÑO DE LA GONADA \bar{x} (mm)	
		LARGO	ANCHO
0.0	Gónada con embriones en desarrollo.	10.00	6.00
5.0 *	Mínimo, ya que se observó la gónada repleta de embriones.	12.00	8.00
7.5 *	Se observan muchos huevos grandes, llenos de vitelo y unos pocos atrésicos.	11.75	7.25
10.0 *	Pocos huevos, no muy grandes y casi transparentes.	9.00	6.00
12.5 *	Gónada pequeña, con huevos pequeños y blanquecinos.	8.50	5.50

Tabla No. 6.- Efectos causados por la diethyletilbestrol que fué administrada en las hembras mientras estaban preñadas.

* La coloración y el tamaño del cuerpo de las hembras fueron, aparentemente, muy semejantes a las hembras control.

De acuerdo a ésta tabla, se observa para la dosis 12.5 mg/Kg que el efecto en la gónada es significativo, ya que se presentan predominantemente ovocitos atrésicos; en las dosis de 10 y 7.5 mg/Kg la cantidad de ovocitos atrésicos se ve disminuída y se presenta una gran cantidad de ovocitos con vitelo. Al término del tratamiento (al nacimiento de las crías), las hembras F1 se alimentaron con la dieta normal (pelet de trucha), carente de hormona, observándose después de 30 días que en las gónadas son muy pocos los ovocitos atrésicos para todas las dosis, las gónadas se observan con las mismas características que las del grupo control y en el grupo que había sido tratado con 5 mg/Kg después de éste tiempo de reposo, observamos la presencia de embriones en desarrollo al igual que en algunas hembras control.

Cohen (1946) menciona que al tratar a hembras platys con benzoato de estradiol durante tres meses cada mes se suspendía el tratamiento y las ponía con machos no presentándose desarrollo de embriones, pero al retirar el tratamiento al tercer mes se pusieron nuevamente con machos y después de seis semanas hubo el desarrollo de embriones lo que indica que la gónada tuvo la capacidad de recuperación.

La hormona actuó, primordialmente, a nivel gónadal y aparentemente su efecto fué ínfimo en cuanto a forma, color o tamaño del organismo dado que, en términos generales, el mecanismo de acción de la diethylestilbestrol es idéntico al que utilizan las hormonas esteroides naturales, pero su mayor potencia biológica se explica en base a que las modificaciones estructurales de la molécula: 1) La protegen de degradaciones catabólicas incrementando su vida media, 2) Incrementan su afinidad en la unión con el sitio activo de sus células blanco, condicionando así una acción de mayor potencia (Flores y Cabeza 1990), en las gónadas y parcialmente en otros órganos y estructuras debido a las bajas dosis manejadas.

En las hembras F2 se observó lo siguiente:

DOSIS (mg/Kg)	EFECTOS OBSERVADOS EN GONADA	TAMAÑO DE LA GONADA \bar{x} (mm)	
		LARGO	ANCHO
0.0	Gónada con muchos huevos llenos de vitelo.	10.00	9.00
5.0 *	Huevos grandes, llenos de vitelo y buena irrigación sanguínea. Gónada grande.	15.00	10.00
7.5 *	Gónada de menor tamaño que la anterior, pero con huevos grandes llenos de vitelo y también unos pocos atrésicos.	11.00	7.00
10.0 *	Gónada grande con huevos grandes llenos de vitelo y hacia las puntas de la misma, huevos atrésicos en menor cantidad.	12.00	6.00
12.5 *	Gónada grande con huevos grandes llenos de vitelo y otros pocos atrésicos.	11.00	6.00

Tabla No. 7.- Efectos causados por la diethylestilbestrol administrada indirectamente a las hembras F2 durante su desarrollo embrionario.

* En cuanto a color y forma del cuerpo de las hembras F2, fué el mismo patrón que se observó en las hembras control F2.

Respecto a las hembras F2 vemos en la tabla No. 7 que el efecto de la hormona, aparte de orientar la determinación del sexo hacia un sentido, es, en otras partes del organismo, mínimo no observándose cambios aparentes en su forma, tamaño o color.

En todas las dosis la gónada se desarrolla de manera similar notándose siempre saludable y ovocitos con vitelo.

Al ponerse éstas hembras con machos que no han recibido ningún tratamiento, en la prueba de fecundidad demostraron que éstos ovocitos eran viables y capaces de generar un grupo de embriones que posteriormente fueron las crías F3 que no presentaron ningun efecto aparente debido al tratamiento hormonal de sus madres.

Para los machos F2 la gónada se observó de la siguiente forma:

DOSIS (mg/Kg)	EFFECTOS OBSERVADOS EN GONADA	LONGITUD DE LA GONADA EN mm
0.0	Es blanca, su consistencia es firme.	11
5.0 *	Es color cremada muy inconsistente, es decir se deshace con facilidad.	10
7.5 *	Es color blanquecina, su consistencia es mayor.	10
10.0 *	Es transparente, observándose a simple vista las células que contiene, su consistencia es firme.	8
12.5 *	Su apariencia es muy compacta y densa de color blanco.	7

Tabla No. 8.- Efectos observados en los machos F2 que recibieron la diethylestilbestrol durante su desarrollo embrionario.

* En cuanto a color y tamaño los machos F2 fueron aparentemente iguales a los del grupo control.

En lo que toca a los machos F2, su gónada si se ve afectada ya que no son fértiles, en la prueba de fecundidad se demostró que una vez que han madurado sexualmente, o que por lo menos tenían ya la edad de los machos considerados maduros o adultos se colocaron con hembras maduras, pero vírgenes, durante 3 meses y nunca produjeron descendencia, aunque su comportamiento reproductivo fué normal; ésto se puede deber a que, como lo menciona Liley (1969), los estrogénos evitan la formación de estructuras masculinas y que por lo tanto aunque se presenten gametos quizá no existan las estructuras necesarias para que lleguen a su destino o probablemente no se encuentran debidamente formadas, pero sí hay secreción de hormonas masculinas ya que los peces desarrollan las características sexuales secundarias y el comportamiento reproductivo que son eventos dependientes de las hormonas circulantes en el cuerpo del individuo. (Hoar, 1975; Pandian y Sheela, 1995)

Por otro lado, Cohen (1946) observó que al tratar a machos platys con benzoato de estradiol, la espermatogénesis se vio suprimida y la gónada fue inducida hacia un ovo-testis en algunos casos, indicando que la administración de estrógenos en las etapas tempranas del desarrollo sobrepasa las secreciones testiculares lo que origina el desarrollo de estructuras femeninas, casi a la par de las masculinas si el tiempo de administración y la dosis no son óptimos.

La forma del cuerpo, el color y el tamaño, tanto de hembras como de machos F2 no se ve alterado en lo más mínimo, confundándose fácilmente, si se mezclaran, organismos que han recibido hormona con otros sin ningún tratamiento.

Respecto al comportamiento reproductivo y de convivencia, se observó completamente normal tanto para machos como para hembras, como se mencionó en el bioensayo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir que:

1) La Diethylestilbestrol a una concentración de 10.0 mg/Kg de alimento produjo un 84.3% de hembras, siendo el mayor porcentaje obtenido en el estudio administrada durante el desarrollo embrionario y 6.25 mg/Kg produjo 100% de hembras en el bioensayo administrada durante el desarrollo embrionario y después de nacidas las crías por un mes más.

2) La Hormona produjo cambios en las proporciones sexuales de manera discontinua en las dosis, siendo la mayor 5.3 hembras : 1 macho en la dosis antes mencionada.

3) La Diethylestilbestrol si produce efectos feminizadores en peces *Xiphophorus helleri* que han recibido la hormona a nivel embrionario, no observándose daño alguno, en las hembras pero sí infertilidad en los machos.

4) Si se producen efectos secundarios en la gónada de las hembras reproductoras (F1) ya que a mayor dosis, mayor retraso en la ovogénesis.

5) El periodo de definición de la gónada no se cubrió completamente y por lo tanto no se obtuvo una población 100% hembras.

Recomendaciones:

1) Se debe hacer un estudio donde nuevamente se prueben las dosis empleadas durante el bioensayo y el estudio pero a diferentes tiempos de duración para conocer realmente el periodo de determinación del sexo y así poder modificar efectivamente dicha determinación hacia el sexo que buscamos.

2) Es necesario realizar un mayor número de pruebas con hormonas para poder conocer realmente los efectos de éstas sobre la determinación del sexo de los peces y encontrar la que ofrezca mejores resultados con la especie como lo mencionan Espinoza de los Monteros y Labarta (1987).

3) El tiempo durante el cual se debe administrar la hormona es también un factor que debe ser determinado con mayor exactitud ya que en éstos organismos el periodo de determinación del sexo se inicia durante el desarrollo embrionario y se continúa después del nacimiento.

4) Las edades de los organismos a tratar deberá ser controlada, es decir, si se van a tratar hembras preñadas que estén completamente maduras no en maduración, para que el efecto de la hormona se de principalmente en los embriones y menos en ellas ya que Lib (1992), dice que los organismos tratados después del nacimiento son capaces de soportar mejor dosis altas de hormona a diferencia de cuándo se trata a las hembras preñadas pues se altera su propio metabolismo y el desarrollo de los embriones, y esto se incrementa si dichas hembras son muy jóvenes.

Finalmente podemos decir que una vez controlados todos éstos factores es conveniente el empleo de hormonas para una producción comercial de peces de ornato con las características, según la especie y el sexo, que hallamos seleccionado, pues es éste un procedimiento de bajo costo y de fácil implementación. Por lo que se recomienda hacer un estudio a largo plazo donde se pueda probar cada uno de los factores mencionados con la especie de interés así como con otras de importancia comercial, ya sea con fines de acuarismo, de consumo, repoblación, control de plagas ó cualquier otro.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, V. J. 1970, Peces mexicanos (Claves), Secretaría de Industria y Comercio. México. 166 pp.
- Anderson, C. E. y Smitherman, R. O. 1973, Production of normal male and androgen sex-reversed *Tilapia aurea* and *T. nilotica* fed a comercial catfish diet in ponds. Culture of exotic fish Symp. Proc. Fish Culture Section. Am. Fish Soc. Auburn, Alabama. 34-42.
- Armijo, O. A. 1994, Situación actual del acuarismo en México. Datos estadísticos y su importancia en la economía nacional. En: Enfermedades de peces de ornato y su importancia en sanidad acuícola. UNAM, FMVZ, México.
- Arrignon, J. 1984, Ecología y Piscicultura de aguas dulces. Ed. Mundi - Prensa, Madrid. 394 pp.
- Ashby, K. R. 1957, The effect of steroid hormones on the brown trout (*Salmo trutta* L.) during the period of gonadal differentiation. J. Embriol. Exp. Morphol. 5: 225-249
- Bailey, R. J. 1933, The ovarian cycle in the viviparous teleost *Xiphophorus helleri*. Biol. Bull. 64:206-225.
- Baldwin, F. M. y Goldin, H. S. 1940, Effects of testosterone propionate of the female viviparous teleost *Xiphophorus helleri*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 42: 813-819.
- Balinski, B. I. y Fabian, B.C. 1983, Introducción a la embriología. Ed. Omega, S.A. España. pág. 498.
- Bardach, J. E., Ryther, J. H. y MacLarney, W. O. 1972, Aquaculture. Wiley-Inter-Science. New York.
- Basavaraja, M. C. et. al. 1990, Induction of sex reversal in *Oreochromis mossambicus* by Diethylstilbestrol. J. Appl. Ichtyol. 6: 46-50.
- Beaugrand, J. P., Caron, J., Comeau, L. 1984, Social organization of small heterosexual groups of green swordtail *Xiphophorus helleri* pisces Poeciliidae under conditions of captivity. Behaviour, 91 (1-3): 24-60.
- Berkowitz, P. 1937, Effects of oestrogenic substances in *L. reticulatus*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 36: 416-418.
- Bulkley, R. V. 1972, Diethylstilbestrol in catfish feed. Trans. Am. Fish Soc. 101: 537-539.
- Calhoun, W. E. y Shelton, W. L. 1983, Sex ratios of progeny frim mass spawnings of sex reversed brood stock of *T. nilotica*. Aquaculture, 33: 365-371.

- CETENAL 1982, Carta Topográfica E-14 A-69, Escala 1:50,000 México.
- Chang, S. T. H. y Yeung, W. S. B. 1983, Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. En Fish Physiology. (Hoar, W. S. et al Eds.) Vol. IX B pág. 171-222. Acad. Press. New York.
- Cifuentes, L. J. L. et al, 1990, El océano y sus recursos. Vol. XI Acuicultura. Serie La Ciencia desde México, Fondo de Cultura Económica. México.
- Clemens, H. P. et al, 1966, The effects of feeding methyltestosterone to Guppies for sixty days after birth. COPEIA, 2: 280-284.
- Cohen, H. 1946, Effects of sex hormones on the development of the platyfish *P. maculatus*. Zoológica, 31: 121-128.
- Eckstein, B. y Spira, M. 1965, Effects of sex hormones on the gonadal differentiation in a cichlid *Tilapia aurea*. Biol. Bull. 129: 482-489
- Espinoza de los Monteros, J. y Labarta, U. (Eds.), 1987, Nutrición en acuicultura I y II. CAICYT, Industrias Gráficas de España, Madrid.
- Flores, L. F. y Cabeza, F.A. 1990, Endocrinología. Ed. Francisco Méndez Cervantes. México. 639 pp.
- Gannam, A. L. y Lovell, R. T. 1991, Effects of feeding 17amethyltestosterona, 11-ketosterona, 17 β -estradiol, and 3,5,3-triiodothyronine to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 92: 377-388.
- George, T. y Pandian, T. J. 1995, Production of ZZ female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops*, by endocrine sex reversal and progeny testing. Aquaculture 136: 81-90.
- Goetz, F. W. et al, 1979, Effects of estradiol-17 β and 17a-methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Aquaculture 17: 267-278.
- Goldstein, A. et al 1978, Farmacología. Ed. LIMUSA, México. 1000 pp.
- Guerrero III, R. D. 1975, Use of androgen for the production of all male *Tilapia aurea* (Steindachner). Trans. Am. Fish. Soc. 104: 324 - 348.
- Ham, R. 1981, The ecology of six native and two introduced fish species in the Enoggera Creek, system, south-east Queensland. Hons Thesis. Giffith University, Brisbane. 157 pp.
- Herman, R. L. y Kincaid, H. L. 1988, Pathological effects of orally administred estradiol to the rainbow trout. Aquaculture, 72: 165-172.

- Hernández, B. S. F.** 1988, Inversión sexual de la mojarra *Cichlasoma urophthalmus* a través de la administración de la 17-a-Methyltestosterona en el alimento. Tesis de maestría. IPN Mérida, Yucatán.
- Hildemann, W. H.** 1954, Effects of sex hormones on the secondary sexual characters of *Lebistes reticulatus*. J. Epyl. Zool. 126: 1-15
- Hoar, S. W.** 1969, Reproduction. En: Fish Physiology. (Hoar, S. W., Randall, D.J. y Donaldson, E. M. Eds.) Vol. III Acad. Press. New York.
- Hoar, S. W.** 1975, Fisiología general y comparada. Ed. Omega, S. A. España.
- Hopkins, K. D. et al** 1979, Estrogen sex reversal of *Tilapia aurea*. Aquaculture, 18: 263-268.
- Hopper, A. F. Jr.** 1943, The early embryology of *Platypoecilus maculatus*. COPEIA pp. 218-224.
- Huet, M.** 1983, Tratado de piscicultura. Ed. Mundi - Prensa, Madrid. 753 pag.
- Hunter, G. A. y Donaldson, E. M.** 1983, Hormonal sex control and its application in fish culture. En: Fish Physiology, (Hoar, S. W., Randall, D.J. y Donaldson, E. M. Eds.) Vol. IX B. Acad. Press. New York.
- Jameson, Jr. E. W.** 1988, Vertebrate reproduction. Jhon Wiley & Sons. N.Y. USA.
- Jensen, G. L. y Shelton, W. L.** 1979, Effects of estrogen on *T. aurea*: Implications for production of monosex genetic male tilapia. Aquaculture 16: 233 - 242.
- Jiménez, G. F. y Auró, de O. A.** 1994, Enfermedades de peces de ornato y su importancia en sanidad acuícola. UNAM, FMVZ. México.
- Kallman, K. D.** 1975, The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. Handbook of genetics, 4: 81 - 132, N.Y. USA.
- Kallman, K. D.** 1984, A new look at sex determination in poeciliid fishes. In: B. J. Turner (Ed.) Evolutionary genetics of fishes. Plenum publ. Co. New York, USA. pp. 95-171.
- Kavumpurath, S. y Pandian, T. J.** 1993, Masculinization of *Poecilia reticulata* by dietary administration of synthetic or natural androgen to gravid females. Aquaculture, 116: 83-89.
- Kramer, C. R. y Kallman, K. D.** 1985, Sex differentiation of somatic tissue in the unsexualised gonad primordia of the embryos of three species of poeciliid fish. J. Anat. 140: 269-277.
- Lagler, K. F.** 1990, Ictiología. AGT Editor.
- Laskowski, W.** 1954, Einige Verhaltensstudien on *Platypoecilus variatus*. Biol. Zentr. 73: 429-438.

- Liley, N. R. 1969, Hormones and reproductive behavior in fishes. En: Fish physiology. (Hoar, S. W., Randall, D.J. y Donaldson, E. M. Eds.) Vol. III Acad. Press, New York.
- Lim, B. H., Phang,-V-P-E y Reddy,-P-K. 1992, The effects of short-term treatment of 17- α -methyltestosterone and 17- β -estradiol on growth and sex ratio in the red variety of swordtail *Xiphophorus helleri*, Journal of aquaculture in the tropics, 7(2): 267-274.
- Litter, M. 1988, Farmacología experimental y clínica. Ed. El Ateneo, 7a ed. Argentina. 1872 pp.
- Liu, C. -Y. 1977, Aspects of reproduction and progeny testing in *Sarotherodon aureus* (Steindachner). M. S. Thesis, Auburn University, Auburn, Alabama.
- Lodi, E. 1979, Instances of sex inversion in the domesticated swordtail, *X. helleri* Heckel (Pisces; Osteichthyes). Experientia 35: 1440 - 1441.
- López, C. M. 1994, Utilización de cultivos de apoyo en la producción de *Betta splendens*. Tesis UNAM.
- Meffe, G. y Snelson, F. F. 1989, Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae). Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey, USA.
- Milton, D. A. y Arthington, A. H. 1993, Reproductive biology of *G. affinis holbrooki* (Baird and Girard), *X. helleri* (Günther) and *X. maculatus* (Heckel). (Pisces; Poeciliidae) in Queensland, Australia. J. Fish Biol, 23: 23 - 41.
- Nagahama, Y. 1983, The functional morphology of teleost gonads. En: Fish physiology. (Hoar, S. W., Randall, D.J. y Donaldson, E. M. Eds.) Vol. IX A Academic Press. New York.
- Nakamura, M. y Takahashi, H. 1973, Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ. 24: 1-13.
- Padoa, E. 1937, Differenziazione e inversione sessuale (feminizzazione) di avanoti di Trota (*Salmo irideus*) trattati con ormone follicolare. Monit. Zool. Ital. 48: 195-203
- Pandian, T. J. y Sheela, S. G. 1995, Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture 138: 1-22
- Pelissero, C. y Sumpter, J. P. 1992, Steroids and "Steroids-like" substances in fish diets. Aquaculture, 107: 283-301.
- Peters, G. 1964, Vergleichende untersuchungen on drei Subspecies von *Xiphophorus helleri* Heckel (Pisces). Z. Zool. Syst. Evolutionforsh. 2: 185-271.
- Petrovicky, I. 1990, La gran enciclopedia de los peces de acuario. Ed. Susaeta, Madrid.

- Romer, A. S. y Parsons, T. S., 1987, Anatomia Comparada. 5a. ed. Ed. Interamericana. México.
- Rosen, D. E. 1960, Middle-American poeciliid fishes of the genus *Xiphophorus*. Bull. Fla. State Mus. Biol. Sci. 5: 57-242.
- Sanico, A. F. 1975, Effects of 17 α -ethynyltestosterone and estrone on sex ratio and growth of *Tilapia aurea* (Steindachner). M. S. Thesis, Auburn University, Auburn, Alabama.
- Schreibman, M. P. y Kallman, K. D. 1977, The genetic control of the pituitary-gonadal axis in the platyfish, *X. maculatus*. J. Exp. Zool. 200: 277 - 294.
- Schreibman, M. P., Berkowitz, E. J. y van den Hurk, R. 1982, Histological and histochemistry of the testis and ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. Cell Tissue Res. 224: 81-87.
- Scrimshaw, N. S. 1944, Embryonic growth in the viviparous poeciliid fish *H. formosa* Biol. Bull. 87: 37-51
- Shelton, W y Jensen, G. L. 1979, Production of reproductively limited grass carp for biological control of aquatic weeds. Compilation report for project DI-075-ALA. Water resources. Research institute. Auburn Univ. Auburn, Alabama. 260p.
- Sower, S. A. et al 1984, Effects of Estradiol and Diethylstilbestrol on sex reversal and mortality in atlantic salmon (*S. salar*). Aquaculture, 43: 75-81.
- Takahashi, H. 1975a, Functional feminization of genetic males of the guppy *P. reticulata* treated with estrogen after birth. Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ. 26: 223-234.
- Takahashi, H. 1975b, Functional masculinization of female guppies, *P. reticulata*, induced by methyltestosterone before birth. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 41: 499- 506.
- Tavolga, W. N., 1949, Embryonic development of the platyfish (*Platypoecilus*), the swordtail (*Xiphophorus*), and their hybrids. Bull. of Am. Mus. of Nat. Hist. Vol. 94, Art. 4 New York in 1950.
- Tayamen, M. M. y Shelton, W. L. 1978, Inducement of sex reversal in *Sarotherodon niloticus* (Linnaeus). Aquaculture 14: 349-354.
- UNAM 1988, Taller de actualización "Las hormonas en la producción piscícola". Hernández, B.S. y Benítez, F.J.C. (Eds.) ENEP Iztacala. 109 pag.
- Witschi, E. y Crown, E. N. 1937, Hormones and sex determination in fishes and in frogs. Anat. Rec. 70: 121

- Yamamoto, T.** 1969, Sex differentiation. En: Fish Physiology, (Hoar, S. W., Randall, D.J. y Donaldson, E. M. Eds.) Vol. III Acad. Press. New York.
- Yamamoto, T. y Kajishima, T.** 1968, Sex hormone induction of sex reversal in goldfish and evidence for male heterogamety. J. Exp. Zool. 168: 215-222
- Yamazaki, F.** 1983, Sex control and manipulation in fish. Aquaculture 33: 329 - 354.

APENDICE I

ALIMENTO PARA TRUCHA-DESARROLLO PURINA

El alimento que se utilizó en éste estudio es completo y balanceado, para el desarrollo de truchas que midan entre 5 y 15 cm de longitud, para los fines que perseguimos fue necesario molerlo y tamizarlo como se indica en la metodología.

TABLA DE ANALISIS DE CALIDAD:

CARACTERISTICA	PORCENTAJE
HUMEDAD	12.0 % Máximo
PROTEINA	43.0 % Mínimo
GRASA	11.0 % Mínimo
FIBRA	5.0 % Máximo
CENIZAS	10.0 % Máximo
CALCIO	1.2 % Mínimo
FOSFORO	1.0 % Mínimo

INGREDIENTES:

Cereales molidos, combinación de pastas oleaginosas, harinas de origen animal, subproductos alimenticios agrícolas e industriales, subproductos de cereales, aceites de pescado, alfalfa deshidratada, aceites vegetales, suero dulce deshidratado de leche, vitamina A, tiamina, riboflavina, piridoxina, vitamina B-12, pantoteato de calcio, cloruro de colina, niacina, ácido fólico, vitaminas D-3, K y E, ácido ascórbico, cobalto (Carbonato), calcio (Carbonato), fósforo (Roca y ortofosfato), cobre (Oxido), zinc (Oxido), hierro (Sulfato), manganeso (Oxido), antioxidante (Etq. -90 g/Ton), lisina, metionina, y ácido propiónico (Como fungicida).

APENDICE II

PAQUETE ESTADISTICO SPSS/PC+

Listado de datos ordenados: Hormona, Sexo, Frecuencia.

Niveles a valorar: sexo: 1 "Hembra", 2 "Macho".

INICIO DE DATOS:

DOSIS mg/Kg	HORMONA	SEXO	FRECUENCIA OBSERVADA
12.5	1	1	31
	1	2	9
10.0	2	1	69
	2	2	13
7.5	3	1	54
	3	2	14
5.0	4	1	32
	4	2	11

PONDERAR POR FRECUENCIA.

Procesar si hormona = 1. (12.5 mg/Kg)

NPAR TESTS /CHISQUARE freq /EXPECTED 35.48, 64.51.

----- Chi-square Test

Categoria	Casos		
	Observados	Esperados	Residual
9.00	9	14.19	-5.19
31.00	31	25.81	5.19

Total	40		

X ²	gl.	Significancia
2.945	1	.086

Procesar si hormona = 2. (10.0 mg/Kg)

NPAR TESTS /CHISQUARE freq /EXPECTED 35.48, 64.51.

----- Chi-square Test

Categoria	Casos		
	Observados	Esperados	Residual
13.00	13	29.10	-16.10
69.00	69	52.90	16.10

Total	82		

X ²	gl.	Significancia
13.802	1	.000

Procesar si hormona = 3. (7.5 mg/Kg)

NPAR TESTS /CHISQUARE freq /EXPECTED 35.48, 64.51.

----- Chi-square Test

Categoria	Casos		
	Observados	Esperados	Residual
14.00	14	24.13	-10.13
54.00	54	43.87	10.13
	--		
Total	68		

X ²	gl.	Significancia
6.590	1	.010

Procesar si hormona = 4. (5.0 mg/Kg)

NPAR TESTS /CHISQUARE frec /EXPECTED 35.48, 64.51.

----- Chi-square Test

Categoria	Casos		
	Observados	Esperados	Residual
11.00	11	15.26	-4.26
32.00	32	27.74	4.26
	--		
Total	43		
X ²	gl.	Significancia	
1.842	1	.175	