

31960

1  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

INDUCCION SEXUAL EN PECES XIPHOPHORUS HELLERI (POECILIIDAE) A TRAVES DE LA ADMINISTRACION DE LA 17<sup>oc</sup>-METILTESTOSTERONA Y DE DIETILSTILBESTROL, EN EL ALIMENTO

## T E S I S

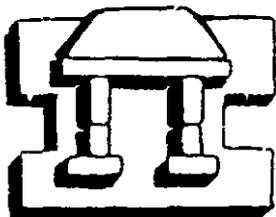
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

P R E S E N T A

ALBA FELIPA MARQUEZ ESPINOZA

DIRECTORA:

DRA. CATALINA B. CHAVEZ TAPIA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

~~1988~~

= 1999

0273024

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

## *DEDICATORIA*

A MI ESPOSO ANTONIO SÁNCHEZ ORTEGA  
POR CAMINAR A MI LADO POR LOS SENDEROS DE LA VIDA.

A MIS HIJOS

RICARDO Y ANTONIO SÁNCHEZ MÁRQUEZ

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Catalina B. Chavez Tapia por su dirección en el desarrollo de esta tesis, con su valiosa ayuda y amistad fue posible llegar a la culminación de este esfuerzo.

A quienes fungieron como sinodales, que con sus observaciones y aportaciones al manuscrito, fue posible lograr un mejor trabajo, gracias a ustedes: Dra. Ma. Cristina Revilla Monsalve, M. en C. Rodolfo Garcia Collazo, M. en C. Silvia Toral Almazan, M. en C. Jorge Luis Hernández Aguilera.

Al Biól. Mario Alfredo Fernández Araiza por contar con su apoyo constante en la realización de este trabajo.

Al Biól. José Del Carmen Benitez Flores por su tiempo y asesoría con respecto al trabajo de histología.

A la M. en C. Leticia Verdín por su asesoría en la interpretación de los cortes histológicos.

Al Biól. Nicolas por su atinada asesoría y ayuda constante en los pequeños y grandes problemas en el manejo y mantenimiento de peces.

Y a todos aquellos que directa o indirectamente me dieron su amistad, ayuda y apoyo.

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
DETERMINACIÓN DEL SEXO	5
LAS GÓNADAS	6
OVARIO	7
TESTÍCULOS	7
ESTEROIDES SEXUALES	8
PRODUCCIÓN HORMONAL	8
EL HIPOTÁLAMO	10
LA HIPÓFISIS	11
EJE HIPOTALAMICO-HIPOFISIARIO-GÓNADAS	11
CÉLULAS DE LEYDIG	11
DIAGNOSIS DE LA ESPECIE	13
ANTECEDENTES	16
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	19
MÉTODOS	20
COLECTA	20
CONDICIONES DE MANTENIMIENTO	20
FERTILIZACIÓN DE LAS HEMBRAS	20
PREPARACIÓN DEL ALIMENTO	20
LOTES DE EXPERIMENTACIÓN	21
I) REGISTRO DE DATOS	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
II) OBTENCIÓN DE LOS ORGANISMOS DE LA F1	22
DIAGRAMA DE FLUJO MT	23
DIAGRAMA DE FLUJO DES	24
RESULTADOS	25
EFECTO DE LA 17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA	25
I) MEDIDAS SOMÁTICAS	25
MORFOLOGÍA EXTERNA	26
EFECTO DE LA MT EN LAS HEMBRAS TRATADAS	32
TIEMPOS DE GESTACIÓN	32
ANALISIS HISTÓLOGICO DEL OVARIO DE LOS CONTROLES	33
DAÑOS PROVOCADOS POR LA APLICACIÓN DE 17 $\alpha$ - METILTESTOSTERONA	36
II) PROPORCION SEXUAL	39
EFECTO DE LA DIETILETILBESTROL	43
I) MEDIDAS SOMÁTICAS	43
MORFOLOGÍA EXTERNA	46
COMPORTAMIENTO	47
TIEMPO DE GESTACIÓN	47
DAÑOS PROVOCADOS POR LA APLICACIÓN DE       DIETILETILBESTROL	48
II) PROPORCION SEXUAL	51
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFIA	61
APENDICE I	64
APENDICE II	65

## RESUMEN

La utilización de tratamientos endocrinos en la inducción de la reversión sexual se han empleado en un gran número de especies de peces. Se han usado para acelerar el crecimiento y obtener en menor tiempo la talla comercial, lograr tener poblaciones monosexo, en tilapias para evitar la reproducción precoz, en salmonidos en el control de enfermedades; en algunas especies de peces de ornato los machos se desarrollan más rápido que las hembras y son más coloridos, su valor comercial es más alto. Las vías de administración son diversas entre las que se encuentran. La inyección subcutánea, disueltas en el agua por inmersión, introducción de cristales bajo la piel y mezclados en el alimento, este último es el más utilizado.

Se seleccionó la especie *Xiphophorus helleri* de la familia Poeciliidae por su marcado dimorfismo sexual, así como por ser vivípara, resulta un modelo ideal para la inducción del sexo durante el desarrollo embrionario. Tiene un periodo de gestación de 35 a 55 días dependiendo de las condiciones y de la temperatura ambiente, las gónadas se forman después de los ocho días de iniciado el desarrollo embrionario, por lo que se indujo el sexo a través de la madre, utilizando  $17\alpha$ -metiltestosterona para machos y dietilestilbestrol para hembras en la dieta, alimentándolas únicamente en la etapa de gestación con dosis de 0.0, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5mg/kg para ambas hormonas y determinar cual concentración era más efectiva en la inducción del sexo en la crías de la F1 y su efecto en las hembras, en la gónada y en su morfología. El tratamiento se llevó a cabo por triplicado utilizando 12 hembras en cada acuario, la dosis más efectiva de la  $17\alpha$ -metiltestosterona fué la de 12.5mg/kg teniendo una población de 85.7% de machos en la F1, a partir de la dosis 7.5, 10.0 y 12.5 mg/kg estadísticamente fueron significativas ( $P < 0.05$ ), afectando directamente la morfología de las madres quienes a los 15 días del tratamiento desarrollan la aleta caudal, formando la espada característica de machos y se engrosaron los primeros radios de la aleta anal, al final del tratamiento parecían machos con el abdomen voluminoso. La dosis más efectiva para la dietilestilbestrol fué la de 10.0mg/kg obteniéndose una población de hembras en la F1 de 84.36%, esta hormona no tuvo ningún efecto en la morfología de las madres. Estadísticamente todos los tratamientos presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Estas dos hormonas no afectaron el crecimiento ni el peso de las hembras, pero si alteraron histológicamente la gónada en la dosis de 12.5 mg/gk se observan una gran cantidad de ovocitos atrésicos, alterándose la ovogénesis, presentándose necrosis ovárica severa. Este es el primer trabajo que presenta un análisis histológico y de toxicidad en las gónadas por efecto del tratamiento. Se utilizaron las dosis más bajas dando buenos resultados, por lo que recomendamos ampliamente su aplicación a nivel comercial en peces de ornato.

## INTRODUCCION

La acuicultura es en la actualidad una fuente importante de producción de alimento para satisfacer la creciente demanda mundial de proteínas. En Latinoamérica, especialmente en México, se han comenzado a realizar proyectos de acuicultura, pero en muchos casos, el principal obstáculo para su éxito es la falta de conocimientos básicos y de las habilidades técnicas necesarias. La cría de organismos acuáticos, aunque se presenta como una novedad para la mayoría de las naciones, ha sido practicada durante milenios. Se tiene información, que desde el siglo V a. C. el chino Fan-Li, realizó la crianza de carpas en estanques y la propagación artificial de peces. La producción de las pesquerías mundiales ha tenido un incremento espectacular, pero la existencia de organismos acuáticos en estado natural son limitadas y en un futuro se llegará a un tope en la explotación de los mismos. El crecimiento de los organismos acuáticos en condiciones controladas, puede constituir una fuente importante de alimento en muchas partes del mundo, en virtud de su gran productividad y el hecho de que las cosechas acuáticas son principalmente de proteínas, la acuicultura tiene la potencialidad de producir grandes cantidades de alimento de bajo costo, pero de ninguna manera está restringida a la producción alimentaria. Las personas que realizan pesca deportiva siempre han confiado en los criaderos para reponer la existencia de peces en estado natural y lo seguirán haciendo en el futuro conforme crezcan las necesidades de recreación en las naciones desarrolladas (Bardach, 1986).

La acuariofilia, es el arte de hacer que los peces vivan y se reproduzcan en acuarios. Los griegos y romanos de la antigüedad vivían rodeados de animales de todo tipo incluidos los peces, los cuales no eran mantenidos en acuarios, sino en grandes viveros, en fuentes de piedra tallada y decorada con surtidores. A comienzos de este siglo la acuariofilia se desarrolla a gran escala y a nivel comercial, se organiza la importación de especies exóticas, en la actualidad esta es una actividad que representa una fuente importante de recursos económicos, tanto en la comercialización de los peces llamados de ornato por su gran colorido y adaptación a la vida en acuarios. En México esta actividad se encuentra en sus inicios, en países de Europa y Estados Unidos es una fuente importante de derrama económica. En Asia el cultivo de peces destinados a ornato, se realiza aplicando muchas de las técnicas utilizadas en la acuicultura para la producción a gran escala (Yamasaki, 1983). Como es la aplicación de hormonas en la obtención de poblaciones monosexo en tilapias y salmonidos (control de enfermedades), en bagres para acelerar el metabolismo y hacer que los peces obtengan en menos tiempo la talla comercial (Donaldson *et al.*, 1978).

Se han realizado trabajos de inducción en reversión sexual en 47 especies, pertenecientes a diferentes familias en las que se han practicado tratamientos endócrinos dentro de las que se encuentran, en grado de importancia son: Cichlidae, Cyprinodontidae, Anabantidae, Poeciliidae, Salmonidae y Cyprinidae.

Las hormonas utilizadas para inducir a la masculinización y a la feminización respectivamente son 17 $\alpha$ - metiltestosterona y estradiol -17 $\beta$ , las cuales, en los procesos de reversión, pueden incrementar la mortalidad sin embargo en los ciclidos y cyprinidos pueden acelerar el crecimiento, utilizando las dosis optimas en la reversión sexual. La inducción de la reversión puede servir como una herramienta para entender los procesos de diferenciación sexual y la producción de poblaciones monosexo en la industria de la acuicultura.

En la Tabla 1 se indican los trabajo con hormonas para la reversión sexual en peces realizados por diversos investigadores.

Tabla . 1. Aportes más importantes de la aplicación de hormonas en peces.

AUTOR	AÑO	RESULTADOS
Padao	1937-39	Inyección de hormonas sintéticas en la reversión de salmones
Berkowitz	1938-41	En <i>Levistes</i> administro estrógenos, en inversión de hembras
Okeda	1943	Inyección subcutánea de etilbestrol, en tilapias
Yamamoto	1958-68	Inducción de la esterilidad en tilapias, y de hembras a machos
Hishida	1965	Administración intraperitoneal, de hormonas
Muller	1969	Reversión endocrina de tilapia
Takahashi	1975	Utilizo metiltestosterona en reversión sexual en crías de <i>Poecilia reticulata</i>
Guerrero	1975	trabajo en reversión de <i>Tilapia aurea</i>
Fagerlund y Mebride	1978	Demostración de metilación y eliminación de testosterona
Johnstone <i>et al.</i>	1983	Excreción del 99% de hormonas administradas en la reversión sexual
Nandeesh <i>et al.</i>	1990	Descripción de bioensayos de niveles hormonales administrados

Tomado de Padian 1995.

En acuicultura se han utilizado esteroides sexuales especialmente andrógenos para acelerar el crecimiento (Donalson *et al.*, 1978). En muchos peces, los machos se desarrollan más rápido que las hembras, en especies ornamentales, los machos son más coloridos que las hembras y estos tienen un valor comercial alto, se han realizado trabajos de masculinización en 47 especies y de feminización en 31. Es deseable que se seleccionen las especies con dimorfismo sexual ya que de acuerdo a las características propias de machos y hembras se podrán identificar con precisión los cambios inducidos por acción hormonal.

Las vías de administración de hormonas son: inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, disueltas en soluciones salinas o suero fisiológico o introducción de los cristales de esteroides bajo la piel procedimiento utilizado (Okeda 1943 y 1949, citado en Yamamoto, 1969) antes de que se fabricaran los esteroides sintéticos.

La inmersión de los organismos en aguas conteniendo esteroides, involucra periodos continuos de exposición de embriones y etapas juveniles, este tratamiento es frecuente en salmonidos (Hunter y Donalso, 1983). El método más frecuente, para la mayoría de las especies en la que se ha hecho inversión sexual, es mezclar los esteroides en el alimento, utilizando las técnicas de evaporación de alcohol (Guerrero, 1975). La revisión realizada por Hunter y Donalson (1983), indica claramente que los tratamientos endócrinos a través de la dieta son los más utilizados en la administración de esteroides, sin embargo el tratamiento más utilizado es la inmersión especialmente en especies de aguas frías y en las etapas de huevo oculado (especies ovíparas) o de alevines, en salmonidos, con el que se reportan hasta el 90% de efectividad. En tilapias se han aplicado las técnicas de inmersión, pero la administración de hormonas a través de la dieta es la más conveniente. En especies vivíparas como *Poecilia reticulata* se han realizado experimentos de inmersión, ocho días antes del nacimiento, sin obtener resultados confiables (Takahashi, 1975).

El desarrollo y organización de la gónada en los perciformes se deriva de un solo primordio germinal y se origina directamente del epitelio peritoneal, es decir, a partir de la parte correspondiente al cortex, sin existir evidencia de que el mesonefros contribuya en su formación, podría ser la responsable de la existencia de un patrón sexual diverso, donde prácticamente se encuentran todos los tipos de sexualidad conocidos. Conociendo las etapas y los tiempos de diferenciación sexual de la gónada, a través de una adecuada administración de hormonas en periodos cortos se podría determinar el sexo de los peces.

Uno de los objetivos de la aplicación de hormonas, es acelerar el crecimiento de los peces en etapas juveniles con periodos más cortos que el tiempo normal. En particular en ciclidos y cyprinidos se han mostrado resultados muy alentadores (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Andrógenos utilizado en la reversión sexual de peces.

NATURALES	PECILIDOS	SALMONIDOS	CICLIDOS	CYPRINIDOS
Testosterona		X	X	
11-ketotestosterona		X	X	X
11-bhydroxyandrostendiona		X		
Androstendiona	X			
Dehydroepiandrosterona			X	

SINTETICOS				
Mibolerone			X	X
9(11)dimethyltestosterona	X			
19-nor-ethynyltestosterona	X		X	
Fluoxymesterona	X		X	
17 $\alpha$ -ethynyltestosterona			X	
Methylandrosteroneidol	X			
17 $\alpha$ -methyltestosterona	X	X	X	X
Acetato de testosterona				X
Propionato de testosterona		X		
Chlorotestosterona		X		
Methyldihydrotestosterona		X		

Tomado de Padian (1995).

Tabla.3. Estrogenos utilizados en la reversión sexual de peces.

NATURALES	PECILIDOS	SALMONIDOS	CICLIDOS	CYPRINIDOS
Estadiol-17 $\beta$	X	X	X	X
Estrona		X	X	X
Estrial			X	
SINTETICOS				
Diethylstilbestrol		X	X	
Ethynylestradiol				
Butilacetato estradiol			X	X
Stilbesterol	X			
Diethyldioxystilben				X
Benzoato estradiol				X
Ethylesternol				X

Tomado de Padian (1995).

## DETERMINACION DEL SEXO

El mecanismo de la determinación del sexo en la mayoría de los peces óseos está en una condición primitiva, los cromosomas están tan poco diferenciados de los autosomas que apenas se pueden distinguir unos de otros, la determinación del sexo puede ser controlada, por los genes dispersos entre los autosomas. El potencial determinante del sexo puede diferir entre las diferentes especies. Los datos disponibles sobre la determinación del sexo en poblaciones de peces, son más extensos en comparación a las de otros vertebrados, es apropiado y común designar los cromosomas sexuales, XX para hembras (homogametos) y XY para machos (heterogametos), Yamamoto (1969), considera que la determinación sexual en *X. helleri*, es poligenica, para machos heterogameticos (XX / XY) y para hembras heterogameticas (ZZ / ZW). Los cambios exactos que guían los genes sexuales a la diferenciación sexual no han sido bien clarificados, el punto importante es que los genes sexuales no son los

directamente determinantes del sexo, pero son genes controladores que inducen la determinación y la diferenciación sexual.

En estudios con salmonidos se ha demostrado que el sistema hipotálamo - hipófisis vía hormonas gonadotropicas (GnRH) es activo durante el tiempo de la diferenciación sexual y los esteroides pueden tener un efecto importante en la inducción del sexo. Estos argumentos representan ventajas y desventajas de la teoría que señala que los esteroides inducen las diferencias del sexo en los embriones, el fenotipo sexual gónadal puede ser manipulado alrededor del tiempo de la diferenciación sexual. Paradójicamente se presenta la feminización de las gónadas con dosis de androgénos. La no especificidad de las hormonas sexuales corticoides, tiene potencial en la inducción sexual (Baroiller *et al.*, 1999).

Los estrógenos inducen hembras y los andrógenos inducen machos. Las hormonas sexuales actúan específicamente en la inducción sexual, dosis efectiva de estrona y metiltestosterona a peces jóvenes son sexógenos. La administración de testosterona radioactiva y dietilelbestrol, ha demostrado que estas se incorporan selectivamente a la gónada juvenil. Al parecer todo indica que la diferenciación sexual de la gónada requiere más hormonas sexuales que otros órganos, con base en estos resultados la teoría de que los esteroides sexuales son inductores naturales ha recibido mayor aceptación (Yamamoto, 1969).

## LAS GÓNADAS

Las gónadas de los peces se originan en la línea media dorsal de la cavidad peritoneal, una gónada a cada lado del mesenterio dorsal, su desarrollo está íntimamente asociado con el sistema excretor, las gónadas son de doble origen, a partir de dos distintos grupos celulares: la más lateral es el cortex o porción cortical, se origina de una elongación de la pared peritoneal dará origen al ovario, y la medula o porción medular que dará origen al testículo. Las células que originan a los gametos son las células germinales primordiales, aparecen primero y migran hacia el interior de la gónada, estas pueden ser fácilmente identificadas en la capa de proliferación del mesotelio (epitelio germinativo). En condiciones normales, los factores genéticos determinan el desarrollo de machos o hembras. Existen trabajos donde se postula que las hormonas son sustancias inductoras de machos y hembras, éstas controlan el curso del desarrollo, ya sea o no que haya hormonas embrionarias especiales en la determinación del sexo. Está bien establecido que la diferenciación del primordio gonadal puede ser modificado con esteroides gonadales similares a los esteroides de los adultos, los androgénos promueven el desarrollo de testículos y los estrogénos de los ovarios (Cohen, 1946).

Las gónadas de los peces tienen un origen bilateral, pero muchas especies en estado adulto presentan una sola gónada, en algunos casos se fusionan los dos primordios durante el desarrollo, en otros una de las gónadas no se desarrolla, otras presentan una fusión parcial de la gónada y sus conductos.

## OVARIO

El ovario es un saco cerrado con sus conductos (oviductos), puede variar desde un simple saco a un órgano complejo con funciones tales como producción de ovocitos, almacenaje de esperma, lugar de fertilización y de alimentación para el desarrollo del embrión.

El ovario de los peces presenta un epitelio germinal derivado de una extensión del peritoneo, que da lugar a los folículos ováricos, justo por debajo del epitelio germinal, se extiende la túnica albugínea, que es una capa muy densa de tejido conectivo. Los folículos formados a partir del epitelio germinal, que recubre la parte interna del ovario, están embebidos en el estroma ovárico que se extiende a partir de la túnica albugínea hacia el interior de la glándula, a su vez, la parte interna del epitelio se pliega dando lugar a los pliegues ováricos que prácticamente obliteran la cavidad ovárica. El epitelio germinal suele variar su grosor con la actividad sexual, siendo máximo durante la época de puesta y mínimo durante el reposo sexual. El folículo ovárico es relativamente simple, en fases tempranas del desarrollo, los ovocitos están rodeados por una capa de células foliculares, a medida que crece el ovocito, las células foliculares incrementan y forman una capa continua y unicelular, llamada granulosa. El tejido conectivo del estroma se organiza formando la teca o envoltura folicular externa, ambas capas están separadas por la membrana basal, en la teca se encuentran, a menudo, capilares, fibras de colágeno y fibroblastos (Essenberg, 1923).

El conjunto de acontecimientos que tienen lugar en el ovario de un pez adulto es: transformación de las oogonias en ovocitos primarios, vitelogénesis, maduración, ovulación. La vitelogénesis, maduración y ovulación son eventos que se distinguen tanto por los sucesos que se desencadenan como por la regulación endocrina en cada uno de ellos los folículos con ovocitos en distintos estados de vitelogénesis que no son ovulados en la época de puesta degeneran en cuerpos atrésicos, este tipo de formaciones son muy comunes en los ovarios de peces post-ovulados, la atresia folicular implica la rotura de la zona radiada y la intervención de las células de la granulosa y de la teca (Zanuy *et al.*, 1987).

## TESTÍCULOS

Los testículos son órganos pares, alargados y unidos por la pared dorsal de la cavidad corporal, el espermiducto sale de la superficie media dorsal posterior de cada testículo y desemboca en la papila urogenital, situada entre el recto y los ductos urinarios. Dependiendo de la especie, la estructura testicular varía, en lobular y tubular, en esta última, las espermatogonias están restringidas a la parte distal del túbulo, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea. La mayor parte de los teleósteos poseen testículos de estructura lobular caracterizada por presentar una serie de lóbulos separados por tejido fibroso conectivo (Carrillo, 1977).

Los testículos en general están rodeados por una delgada capa celular fibrosa o capa albugínea, esta capa sufre variaciones con el ciclo sexual, siendo más delgada durante la madurez y más gruesa durante el reposo, presenta una parte lobular y una intersticial, la primera contiene dos tipos celulares: las células germinales y las células de Sertoli, la segunda posee células intersticiales, fibroblastos y vasos sanguíneos y linfáticos. Las espermatogonias, están situadas en la parte más basal del quiste y están separadas de la membrana basal mediante delgadas franjas de células homólogas a las de Sertoli. Durante la maduración, las células germinales testiculares adoptan una disposición quística, de manera que las células se encuentran invariablemente en la misma etapa de espermatogénesis, por tanto, cada quiste parece derivar de una sola espermatogonia (O Mallery *et al.*, 1993).

## ESTEROIDES SEXUALES

Mediante estudios ultraestructurales e histoquímicos, se ha demostrado que en el ovario de los peces existe actividad esteroideogénica en las células intersticiales o de la teca y en las de la granulosa. El ovario es capaz de sintetizar: corticoesteroides y progestinas, entre las cuales destaca la  $17\alpha$ - $20\beta$ -dihidroxiprogesterona, por su papel en el proceso de maduración de los ovocitos, andrógenos, precursores de los estrógenos tras aromatización y estrógenos, entre los cuales el  $17\beta$ -estradiol es considerado de gran importancia en el proceso de la vitelogénesis.

Las células productoras de esteroides del testículo, han sido identificadas con actividad  $3\beta$ -hidroxiesteroideshidrogenasa, así como a través de sus características ultraestructurales. En las células intersticiales de Leydig, esta actividad es mayor cuanto más avanzada es la madurez testicular y recientemente se ha demostrado que las células de Sertoli producen  $17\alpha$ - $20\beta$ -dihidroxiprogesterona (Kramer *et al.*, 1985). El testículo es capaz de sintetizar: andrógenos, entre los cuales los 11 oxigenados tienen mucha importancia por el papel fuertemente androgénico de la 11-cetotesterona; progestinas, estrógenos, y esteroides conjugados del tipo glucurónidos.

## PRODUCCION HORMONAL

Una hormona es una sustancia química secretada en los líquidos corporales por una célula o un grupo de células que ejerce efecto fisiológico sobre el control de otras células (Zanuy *et al.*, 1987).

Los tipos celulares responsables de la secreción de las gonadotrofinas y la GH se diferencian en la hipófisis durante el desarrollo fetal. La biosíntesis y la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias son estimuladas por la GnRH en general son moduladores, por retroalimentación negativa, estos son factores

gonadales, entre ellos los esteroides (estrógenos, progesterona, andrógenos, peptidos, inhibina y la activina).

Los esteroides constituyen una subclase de lípidos que contienen una estructura esquelética básica de cuatro anillos fusionados denominados ciclopentanoperhidrofenantreno, forman parte de una gran familia de sustancias que incluyen el caucho, los carotenoides, las vitaminas A, E, K y el colesterol. El colesterol, a su vez es convertido en ácidos biliares, hormonas esteroides y vitamina D (O Mallery y Strott, 1993). Las hormonas esteroides, son los estrógenos y los andrógenos, que gobiernan los caracteres sexuales secundarios, el ciclo reproductor, el crecimiento y el desarrollo de los órganos reproductores, ejercen también intensa actividad anabólica proteínica (Harper, 1980). Se denominan estrógenos o sustancias estrógenicas aquellas capaces de provocar estró o celo y producir las características sexuales secundarias femeninas.

El dietilelbestrol es un compuesto sintético, activo por vía oral con actividad estrógenica, derivado del dihidroestibeno, que se introdujo en 1938. No se asemeja químicamente a los estrógenos pero ejerce, potente efecto estrógenico, como se muestra en la fórmula (Fig. 1), es posible que en el organismo pueda ocurrir el cierre del anillo para formar una estructura semejante al núcleo esteroide (Harper, 1980).

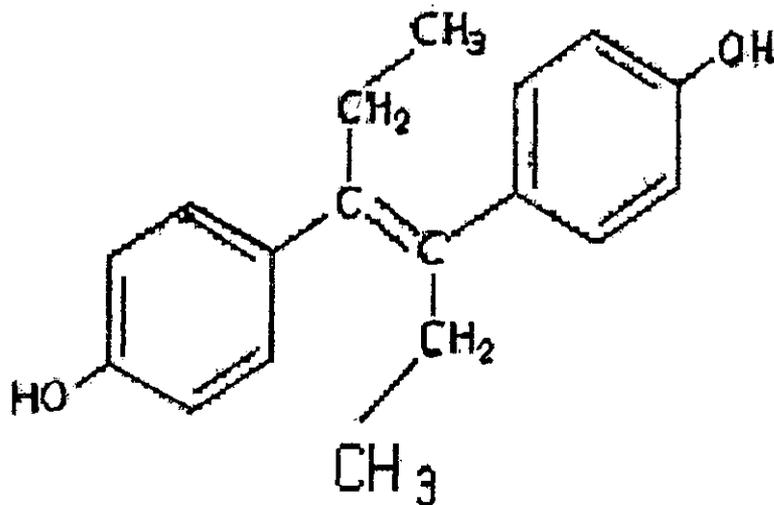


Figura 1. Fórmula química de la hormona Dietilelbestrol. (Tomada de Harper, 1980).

Los andrógenos u hormonas androgénicas, pertenecen al grupo de las hormonas esteroides y derivan del ciclopentano, pehidrofenantreno, actualmente se preparan por síntesis a partir de la testosterona, se han producido derivados que por poseer un grupo metilo en posición 17(ver Fig. 2) son activos por vía oral.

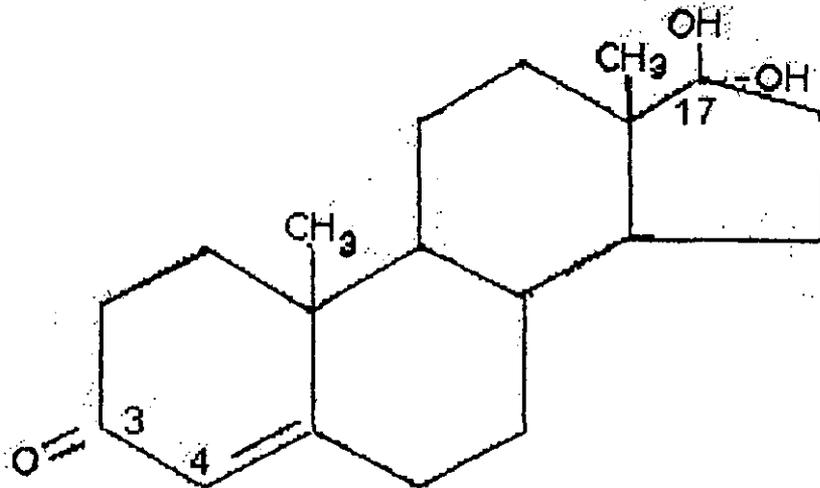


Figura 2. Fórmula química de la hormona 17 $\alpha$ -metiltestosterona (Tomada de Lynch *et al.*, 1982).

## EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo está situado en la región ventral del diencefalo. Es una zona importante para el paso de la información neuronal a través de las células neurosecretoras desde el cerebro hacia el sistema hormonal, sus células se disponen en grupos pares dispuestos bilateralmente. Los cuerpos de estas células, perfectamente diferenciados, forman grupos independientes, sus axones, están en estrecho contacto con la adenohipófisis, forman lo que se conoce como neurohipófisis, las células neurosecretoras responden a señales procedentes del cerebro, liberando un mensajero químico en el terminal del axón, llamado hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) ésta a su vez, actúa sobre las células gonadótropas de la adenohipófisis (Haider *et al.*, 1977).

Las hormonas hipotalámicas que regulan a la adenohipófisis son liberadas a un tipo especial de circulación, el sistema porta hipotalámico hipofisiario y por él llegan a la hipófisis en un flujo unidireccional.

## LA HIPÓFISIS

La glándula hipófisis, tanto por su origen como por su función, es la más compleja e importante del sistema endocrino. Se localiza en la base del diencefalo, por detrás del quiasma óptico está íntimamente asociada al hipotálamo a través de procesos neuronales y de un sistema vascular porta hipotalámico hipofisiario. La hipófisis es considerada como un órgano doble que ha evolucionado de dos orígenes diferentes: una evaginación ectodérmica del techo de la cavidad bucal embrionaria, que da lugar a la adenohipófisis, y una invaginación del proceso ventral del diencefalo, que da lugar a la neurohipófisis o lóbulo nervioso (O Mallery y Strott, 1993).

En los peces como en todos los vertebrados, es la glándula clave para el estudio del control hormonal, todos los procesos fisiológicos están influenciados directa o indirectamente por sus secreciones. La hipófisis es un sitio de síntesis, almacenaje y liberación de varias hormonas pépticas, a través de sus secreciones, el sistema nervioso central controla un rango muy amplio de funciones endocrinas, como son: la reproducción, la osmorregulación, el crecimiento y el metabolismo (Haider *et al.*, 1977).

## EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS

Las dos funciones principales del eje, son producir cantidades regulares de hormonas esteroides sexuales de importancia fisiológica y gametos masculinos sanos en diversas condiciones ambientales. La biosíntesis de los andrógenos ocurre en las células de Leydig (intersticiales) y la espermatogénesis es llevada a cabo en los túbulos seminíferos. El hipotálamo y la parte anterior de la hipófisis participan de forma integral en la regulación de estas funciones a través de la secreción respectiva de la hormona liberadora de gonatropinas (GnRH) por neuronas específicas y de las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH) por células adenohipofisarias específicas (Veldhuis, 1993).

La testosterona y otros esteroides sexuales modulan la secreción de las gonadotropinas y la conducta reproductiva por sus acciones sobre el cerebro y la hipófisis. Se han realizado algunos estudios utilizando implantes de testosterona en el cerebro, estos sugieren que los elementos neurales en la parte media basal del hipotálamo controlan la secreción de las gonadotropinas.

## CELULAS DE LEYDIG

Las células intersticiales de Leydig se localizan en el estroma del tejido conectivo de los testículos, donde están dispersas entre los túbulos seminíferos. Estas células se diferencian y comienzan a secretar andrógenos durante el desarrollo embrionario. La activación de las células de Leydig en el embrión se correlaciona con el comienzo de la diferenciación morfológica dependiente de los

andrógenos. Los andrógenos más potentes son esteroides y algunos estudios han demostrado que la testosterona es el principal andrógeno producido por los testículos y secretado hacia la circulación sistémica (Hurkvanden, 1974).

La presencia de  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hidroxisteroidehidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) y glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PD) son características de las células que sintetizan esteroides sexuales, estas enzimas están presentes en la formación y metabolismo de andrógenos y estrógenos (McKerns 1969), las fluctuaciones en la actividad citoquímica de  $3\beta$ -HSD y G6PD están correlacionadas con los cambios estructurales de las células y nos indican los cambios en la actividad esteroideogénica.

Los testículos de machos jóvenes de *Xiphophorus* de apenas tres días de nacidos presentan una reacción positiva a  $3\beta$ -HSD y G6PD, localizada en el estroma en las células de Leydig y entre las espermatogonias, esta reacción se presenta en todos los machos jóvenes que presentan la aleta anal sin modificaciones, el desarrollo testicular continúa, se forman los conductos eferentes, las espermatogonias proliferan y los quistes contienen espermatoцитos, en esta fase de maduración. Las células positivas a  $3\beta$ -HSD y G6PD son numerosas y muy activas, manifestando una respuesta histoquímica intensa, en la periferia del testículo y alrededor de los tubulos eferentes, este patrón de distribución de las enzimas es característico, hasta la maduración del testículo. En las células epiteliales de los conductos eferentes y en las células de Sertoli se realizaron pruebas de la reacción de estas enzimas y resultaron negativas en todos los estados de desarrollo (Kramer *et al.*, 1985).

El estudio de la actividad de  $3\beta$ -HSD y G6PD en ovarios de hembras de tres días de nacidas muestra células positivas para ambas enzimas, en el estroma de la gónada de previtelogénesis de la oogonia, estas células incrementan en número y actividad conforme el ovario se desarrolla. Las células de la granulosa son negativas a estas enzimas en todas las etapas del desarrollo.  $3\beta$ -HSD es uno de los factores determinantes en la oxidación de 3-hidroxisteroides y 3-ketosteroides. G6PD está involucrada en la formación y la reducción de piridina nucleótido (NADPH), es esencial en la hidroxilación de esteroides (McKerns, 1969). La existencia de ambas enzimas en el tejido gónadal, nos indica la gran actividad esteroideogénica, demostrada mediante la histoquímica esteroideogénica en neonatos de mollis *Poecilia latipinna* (Hurk, 1974). La localización de  $3\beta$ -HSD y G6PD y su actividad en neonatos de *Xiphophorus* y *Poecilia*, indica que la esteroideogénesis se presenta en etapas tempranas del desarrollo, esta actividad es independiente de la maduración de la zona gonadotrópica de la hipófisis. La síntesis de esteroides sexuales en animales muy jóvenes tienen diversas acciones como: la proliferación de espermatogonias y la formación de los conductos eferentes, en la formación de oogonias, los esteroides tienen un efecto en la pituitaria, hipotálamo y la región extrahipotálmica del cerebro en los eventos de maduración prepuberal. En general se acepta que las gonadotrofinas son esenciales para completar el desarrollo gonadal y la

gametogenesis en peces poecilidos. En todos los procesos hormonales es esencial la maduración del eje-hipotálamo-hipofisis-gonadas (LHRH, GTH y esteroides sexuales), (Schreibman *et al.*, 1982).

### DIAGNOSIS DE LA ESPECIE

*Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848), Familia Poeciliidae. Originaria de Centroamérica y de las vertientes del Atlántico de México, se le encuentra ampliamente distribuida en aguas continentales mexicanas, fueron introducidos artificialmente en la parte central de la República Mexicana, viven en agua dulce y cristalina en zonas de abundante vegetación a una temperatura de 22 a 24°C, pH-7. Son peces que presentan un marcado dimorfismo sexual (Fig. 3), de fecundación interna, en el macho maduro se modifican los cinco primeros radios de la aleta anal, el quinto radio forma un gancho mayor que los otros radios, esta estructura recibe el nombre de gonopodio, su función es la transferencia de espermatozoides en el momento de la cópula. Ambos sexos presentan una banda oscura y rasgos rojos en los costados, aleta dorsal de 11 a 17 radios. Esta especie tiene una amplia distribución en la vertiente del Atlántico, desde Veracruz hasta Centroamérica (Alvarez, 1970).

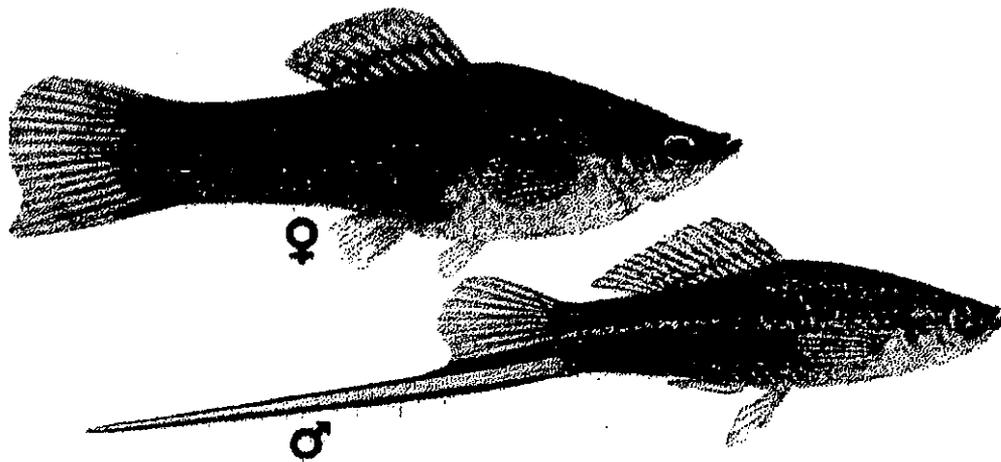


Figura 3. Pareja de *Xiphophorus helleri*, donde se aprecia el dimorfismo sexual.

gametogenesis en peces poecilidos. En todos los procesos hormonales es esencial la maduración del eje-hipotalamo-hipofisis-gonadas (LHRH, GTH y esteroides sexuales), (Schreibman *et al.*, 1982).

### DIAGNOSIS DE LA ESPECIE

*Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848), Familia Poeciliidae. Originaria de Centroamérica y de las vertientes del Atlántico de México, se le encuentra ampliamente distribuida en aguas continentales mexicanas, fueron introducidos artificialmente en la parte central de la República Mexicana, viven en agua dulce y cristalina en zonas de abundante vegetación a una temperatura de 22 a 24°C, pH-7. Son peces que presentan un marcado dimorfismo sexual (Fig. 3), de fecundación interna, en el macho maduro se modifican los cinco primeros radios de la aleta anal, el quinto radio forma un gancho mayor que los otros radios, esta estructura recibe el nombre de gonopodio, su función es la transferencia de espermatozoides en el momento de la cópula. Ambos sexos presentan una banda oscura y rasgos rojos en los costados, aleta dorsal de 11 a 17 radios. Esta especie tiene una amplia distribución en la vertiente del Atlántico, desde Veracruz hasta Centroamérica (Alvarez, 1970).

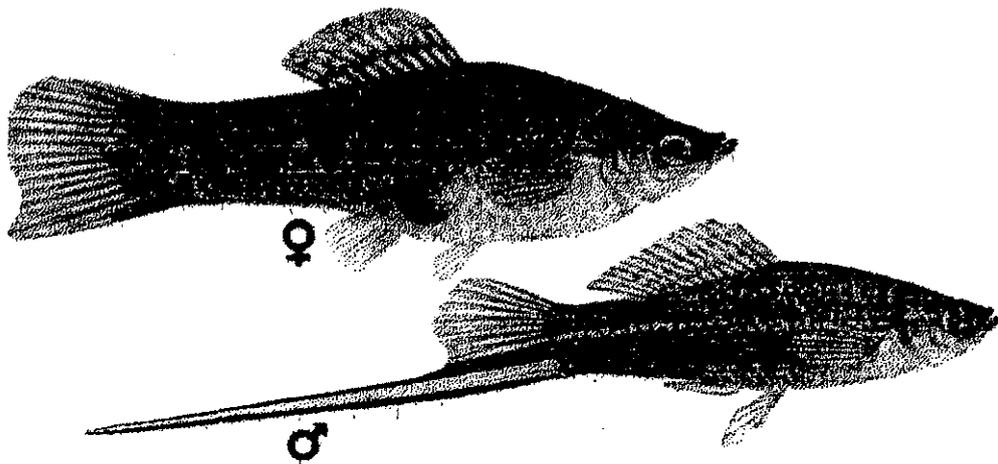


Figura 3. Pareja de *Xiphophorus helleri*, donde se aprecia el dimorfismo sexual.

La madurez sexual en condiciones óptimas se logra entre las 8 y 38 semanas, los caracteres sexuales secundarios son notorios, los machos presentan mayor coloración que las hembras y la modificación de la aleta anal, así como la prolongación de los radios inferiores de la aleta caudal, por esta característica se les conoce comúnmente como pez cola de espada.

El desarrollo de los embriones se lleva a cabo en el folículo ovárico, el esperma es almacenado en paquetes gelatinosos denominados espermatóforos que contienen de 4000-5500 espermatozoides (Zanders, 1969). Después de la inseminación, los espermatozoides pueden sobrevivir en los pliegues del oviducto por largos períodos de tiempo, una inseminación puede ser suficiente para camadas sucesivas. El 30% de las hembras tienen crías hasta 150 días después de retirar al macho, los huevos son fertilizados en un período de dos a tres días, el período de gestación es de aproximadamente 45 a 62 días, este tiempo es dependiente de la temperatura, las crías nacen completamente formadas, en algunos casos se observa el saco vitelino, el nacimiento de las crías por camada es de 30-50 dependiendo de la edad y el tamaño de la hembra (Kallman, 1975).

Durante el desarrollo embrionario, aproximadamente a los siete días, el embrión tiene una longitud de 2.8mm y se observa la formación de cordoncillos gónadales en la parte dorsal del peritoneo. A los 8.4 días tiene una longitud de 3.57 mm y se presentan claramente formadas las gónadas (Tavolga, 1949). El sexo se empieza a definir cuando se tiene una longitud de 8mm. A los 10mm, la gónada es pequeña, una a cada lado de la cavidad del cuerpo, inmediatamente debajo de la vejiga gaseosa, suspendida dentro de un saco peritoneal, se presentan dos clases de células: células germinales primordiales y células más pequeñas con el núcleo elongado, no hay diferencias con las células peritoneales que se encuentran rodeando a las células germinales formando los folículos. Las células germinales primordiales son inconfundibles, son muy grandes en comparación con las células del cuerpo del pez, miden aproximadamente 14.4  $\mu$  de diámetro, con un núcleo de 8.4  $\mu$ , pueden encontrarse en forma individual o con dos o más células (Essenberg, 1923).

En la diferenciación a hembras, al inicio del desarrollo ovárico las células aumentan rápidamente de tamaño, durante esta fase los folículos alcanzan aproximadamente el tamaño medio, degenerando y siendo absorbidos, este proceso es conocido como retrogresión, identificándose tres clases, que consisten básicamente en la formación de los folículos y la degeneración de los mismos, así como la reabsorción completa de las células germinales y células epiteliales. Cuando la longitud de la hembra es entre 11 y 16mm, la gónada indiferenciada se observa pareada se empiezan a formar dos ovarios cerca uno del otro, y la parte media se fusiona dentro de la gónada. En el ovario adulto, el contorno externo es regular y se compone de células germinales primordiales y células peritoneales, la gónada gradualmente aumenta de tamaño y la fusión de los dos ovarios se realiza

en posición antero posterior al margen dorsal y ventral de la misma, la parte externa de la gónada es de origen peritoneal. La formación de los oviductos se inicia en el momento en que se fusionan los ovarios, estos se encuentran completamente fusionados al tejido urogenital, la formación de los conductos se realiza a partir de dos primordios uno anterior y otro posterior, estos tienen una proliferación celular activa formando los conductos a lo largo de la porción media de la cavidad del cuerpo en un eje dorsal del mesenterio. El oviducto de la hembra adulta es muy corto, está formado de tres capas: la externa, muscular, la media de tejido conectivo y la interna epitelial. En el oviducto se forman pliegues a manera de bolsas donde se alojan los espermatozoides y pueden mantenerse vivos durante 160 días, el oviducto es sinuoso y se abre por atrás del ano, (Essenberg, 1923).

En la diferenciación de machos, el testículo es del tipo hacinoso, los cordones y tubulos sexuales se forman de células peritoneales exclusivamente, la diferenciación en su inicio es principalmente un proceso de formación de tubulos, el testículo se encuentra pareado y permanece pareado en el adulto, la formación de cordones es antero posterior, los túbulos presentan un arreglo o acomodo radial. En la morfología de los pequeños peces el tercer radio de la aleta anal se observa con un diámetro mayor al de los otros radios, la transformación de la aleta anal en el gonopodio como órgano intromitente se desarrolla más tarde, la gónada se diferencia en testículo mucho antes que ocurra la modificación de la aleta anal. Los espermiductos son más largos que los oviductos, esto se debe a que los testículos se encuentran en una posición anterior a la abertura urogenital, ésta se encuentra en el gonopodio (Schreibman *et al.*, 1977).

## ANTECEDENTES.

Los peces *Xiphophorus helleri* (Poeciliidae) se adaptan fácilmente a las condiciones de acuario. Se les utiliza para una gran cantidad de trabajos en investigación ya que se pueden manipular fácilmente.

Essenberg, en (1923), describe los procesos de la diferenciación sexual de *Xiphophorus helleri* en cada una de sus etapas tanto del ovario como del testículo, así como la diferenciación de las células y de los diferentes tejidos que están involucrados en todo el desarrollo, ilustrando los procesos con series de dibujos. En 1926 este autor menciona que la especie presenta reversión sexual espontánea dependiendo de las condiciones del medio ambiente.

Witschi y Crow, en (1937) pusieron testosterona en el agua del acuario donde se mantenían hembras preñadas de *X. helleri* presentándose abortos y la reabsorción de embriones.

En el pez espada, *X. helleri*, Badwin y Goldin (1940) reportaron que la administración de andrógenos a hembras jóvenes presentaron las características sexuales secundarias de macho, como la formación de aleta caudal en forma de espada y el gonopodio, también se indujo la masculinización de la gónada y la degeneración de ovocitos.

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 el que realizan los verdaderos machos genéticos. La gónada se observó pequeña y con pocos ovocitos, tendiendo a la degeneración y posteriormente a la formación de estructuras masculinas, éstos organismos fueron más pequeños que los controles.

Tavolga (1949), describe y numera el proceso embrionario de *X. helleri* desde huevo (estado 1) hasta el nacimiento (estado 26), el cual tiene una longitud de 5.69 mm, con una duración de 22 a 30 días, en el estado 18 después de 8.4 días del inicio del desarrollo del embrión, cuando las gónadas son visibles, el organismo tiene una longitud de 3.57 mm no existiendo evidencias de dimorfismo sexual.

Takahashi (1975), trabajó con hembras grávidas de *Poecilia reticulata* administrándoles metiltestosterona en el alimento a una concentración de 400 mg/Kg de alimento, durante 8 a 10 días antes del nacimiento, las crías al nacer

fueron alimentadas con una dieta normal, este autor afirma que el tratamiento indirecto fue más efectivo que el aplicado directamente a los peces.

Anderson y Smitherman (1978), utilizaron tilapia para obtener poblaciones monosexas administrándoles  $17\alpha$ -etinitestosterona en el alimento, ya que estos peces alcanzan la madurez sexual a los cinco meses y su talla es pequeña, no se obtuvieron resultados satisfactorios, pero se avanzó en el conocimiento de esta hormona.

Lodi, (1979), implementó su experimento con lotes de *X. helleri* en la búsqueda de peces hermafroditas o de gonocorismo, ya que estudios de esta especie en los años treinta mencionan casos de inversión sexual de hembras adultas cuyas gónadas han formado testículos; incluso identifican ovocitos atrésicos. Este autor demuestra que en las poblaciones de esta especie existen dos tipos de machos: algunos muy jóvenes ya presentan los caracteres sexuales secundarios (dos meses de edad) y son de tallas pequeñas, y otros se diferencian hasta los cinco meses de edad y antes de manifestar los caracteres de machos tienen la apariencia de hembras. Plantea que otros autores podrían confundir este tipo de machos con hembras adultas. En el laboratorio, se demuestra la existencia de las dos clases de machos, lo que pone en evidencia una carencia de los controles experimentales de inversión sexual misma que siendo errónea posteriormente ha sido citada como una característica de la especie por diversos autores (Essenberg 1926).

Schreibman *et al.*, (1982), examinaron la distribución de  $3\beta$ -HSD y G6PD en machos y hembras de *X. maculatus* de tres días a siete meses de edad, identificando las células que sintetizan esteroides sexuales y los procesos de maduración sexual.

Beaugrand (1984), estudió la organización social de grupos heterosexuales de *X. helleri*, en condiciones de cautiverio (acuarios), observando que los machos son más agresivos que las hembras, el macho dominante es el responsable del 80 al 85% de la actividad sexual, y ocupa la mayor parte del acuario defendiendo un territorio con hembras y teniendo el control del alimento, el resto de los machos son limitados a un área pequeña.

Kramer y Kallman (1984), realizan investigaciones con *X. helleri* para saber si es posible determinar el sexo en estados tempranos del desarrollo, encontrando que a partir de la etapa 18 del desarrollo embrionario (Tavolga, 1949) es posible reconocer un dimorfismo sexual basado en ciertos rasgos somáticos de la gónada, confirmando las descripciones de Tavolga así como el tamaño y edad del organismo.

Basavaraja (1990), probó la eficacia del estrógeno dietilestilbestrol (DES) a concentraciones de 25, 50, y 100 ppm en *Oreochromis mossambicus* de 8-10 mm de longitud total. Con las dos últimas concentraciones obtuvo una inducción del

100% no presentándose intersexualidad ni esterilidad y demuestra la alta eficacia de esta hormona para producir solo hembras.

Grannam (1991), utilizó 17-metiltestosterona en la dieta de los bagres *Ictalurus punctatus*, a diferentes concentraciones (2, 8 y 32 mg./kg). Con la dosis de 2 mg/kg, encontró un incremento en peso del 14% con respecto a los controles y en las más altas no se incremento el peso; en todos los organismos tratados se presentó un aumento en el tamaño de los testículos, mediante el análisis histológico observó una mayor actividad testicular en el proceso de espermatogénesis así como un mayor número de espermatozoides que en los organismos control.

Lim (1992), investigó los efectos de dos hormonas, la 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) y la 17 $\beta$ - estradiol (E2 ), en el crecimiento y diferenciación sexual en juveniles de *X. helleri* variedad roja. Las hormonas se incorporaron al alimento en dosis de 50, 100, 200, 300, 500, y 700 mg/g peso pez. Los organismos consumieron este alimento durante diez días, los resultados mostraron que estas dosis no tienen efecto en el crecimiento, por el contrario las dosis más altas lo inhiben, pero si reportan que son efectivas en la determinación sexual. Con las dosis de 500 y 750 (MT) mg/g se presenta el 100% de masculinización; los grupos de (E2 ) con 750 mg/g se observa el 100% de feminización, el tamaño de los peces fue de 2.0 a 3.05 mm.

Kavupurat y Padian (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 solo machos fueron obtenidas con androsterona, 19-nor-etiniltestosterona a dosis de 200, 300 y 500 mg/Kg, la 9(11)- dimetiltestosterona produjo una reversión incompleta y a altas dosis (400 mg/Kg) observaron que se incrementaba la mortalidad. Determinaron que la androsterona fué la hormona más potente para producir la reversión sexual con la máxima sobrevivencia y funcionalidad.

Nava-Bautista y Rodriguez-Gutiérrez (1995), trabajaron con *X. helleri* administrándoles 17 $\alpha$ -metiltestosterona en dosis de 35mg/Kg a crías recién nacida durante 40 días obteniendo poblaciones solo de machos.

Considerando esta información se plantea la siguiente hipótesis:

## HIPOTESIS

La administración en el alimento de  $17\alpha$ -metiltestosterona inducirá la diferenciación de la gónada de *Xiphophorus helleri* hacia testículo y el dietilstilbestrol hacia ovario.

## OBJETIVOS.

Determinar las dosis y los tiempos óptimos para la obtención de poblaciones de *Xiphophorus helleri* de un solo sexo.

Definir el efecto causado por la  $17\alpha$ -metiltestosterona y del dietilstilbestrol en las crías de hembras preñadas, en la manifestación fenotípica de los caracteres sexuales secundarios.

Identificar la aparición de caracteres sexuales secundarios, durante la pubertad y la etapa adulta de las crías obtenidas de las hembras tratadas con hormonas.

Determinar el efecto de la hormona en las gónadas y en la morfología externa de las hembras preñadas.

## MÉTODOS

### Colecta:

Los peces fueron colectados de poblaciones naturales, en el río Las Estacas del Estado de Morelos, con un chinchorro playero de 10m. de longitud y 1.20m. de caída, abertura de malla de ½ pulgada, se transportaron al laboratorio de la ENEPI en tinas de plástico con capacidad de 60 litros y tapas de unicel con aireación constante, utilizando bombas de aire portátiles de la marca RENA, se colocaron en acuarios de vidrio con capacidad de 150 litros a una temperatura de 24°C, pH 7.2-7.4 y aireación constante, de la red de aire del acuario suministrado por una bomba marca GAST, modelo R 3105-1 con una capacidad de ½ caballo de fuerza, los organismos de *X. helleri* se identificaron con las Claves de Peces Mexicanos (Alvarez, 1970), los peces enfermos y parasitados fueron separados y a los sanos se procedió a adaptarlos a la vida en el laboratorio manteniéndolos seis días en ayuno después de este tiempo se les alimentó con peletizado para trucha Salmón starter No. 2. De estos lotes se seleccionó la población de trabajo, de los cuales al diferenciarse los machos cuando presentaron el engrosamiento del gonopodio y la prolongación de los radios inferiores de la aleta caudal fueron separados de las hembras.

### Condiciones de mantenimiento:

Se mantuvieron machos y hembras por separado, hasta que alcanzaron la madurez sexual, en acuarios de 100 litros, los cuales presentaban condiciones controladas de temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH 7.2-7.4, aireación constante, de la red de aire del acuario de la escuela.

### Fertilización de las hembras:

Se colocaron 12 hembras y 24 machos en cinco acuarios de 54 litros, los cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH 7.2-7.4, aireación constante y fotoperiodos de 12 horas, por un periodo de dos días para lograr la fertilización de las hembras. Los machos se retiraron dejando a las hembras preñadas.

### Preparación del alimento:

La  $17\alpha$ -metiltestosterona y de dietilestilbestrol de los laboratorios SIGMA, presentan una gran estabilidad química, son fácilmente absorbidas a través del intestino, pasando al torrente circulatorio para ser transportadas a las células blanco.

El alimento hormonado se preparó de acuerdo al método utilizado por Guerrero (1975). El alimento fue proporcionado *ad libitum* en única dosis al día a las 10:00 A.M., teniendo cuidado de que fuera consumido en su totalidad (sí

quedaba alimento en el fondo del acuario éste podría ser consumido más tarde ya que la hormona no se disuelve en el agua).

### Lotes de experimentación:

En cada acuario se colocarán 12 hembras preñadas (figuras 5 y 6).

Lote I de MT		Lote II de MT		Lote III de MT	
Acuario		Acuario		Acuario	
1) exp.	5 mg/kg	6) exp.	5 mg/kg	11) exp.	5 mg/kg
2) "	7.5 mg/kg	7) "	7.5 mg/kg	12) "	7.5 mg/kg
3) "	10 mg/kg	8) "	10 mg/kg	13) "	10 mg/kg
4) "	12.5mg/kg	9) "	12.5mg/kg	14) "	12.5mg/kg
5) control	0.0 mg/kg	10) control	0.0 mg/kg	15) control	0.0 mg/kg

Lote I de DES		Lote II de DES		Lote III de DES	
Acuario		Acuario		Acuario	
1) exp.	5 mg/kg	6) exp.	5 mg/kg	11) exp.	5 mg/kg
2) "	7.5 mg/kg	7) "	7.5 mg/kg	12) "	7.5 mg/kg
3) "	10 mg/kg	8) "	10 mg/kg	13) "	10 mg/kg
4) "	12.5mg/kg	9) "	12.5mg/kg	14) "	12.5mg/kg
5) control	0.0 mg/kg	10) control	0.0 mg/kg	15) control	0.0 mg/kg

### 1) Registro de datos.

A todas las hembras tratadas, se midieron los siguientes parámetros: longitud patrón, longitud total, longitud de la aleta caudal ( $\pm 0.1\text{mm}$ ), coloración y peso total ( $\pm 0.1\text{ gr.}$ ). Para identificar los efectos de las hormonas en la gónada se sacrificaron al azar hembras tratadas a intervalos de diez días y se tomaron en cuenta los siguientes datos: morfología externa, longitud total (LT), longitud patrón (LP), longitud de la aleta caudal (LAC) (Fig. 4) y peso total. Se extirparon las gónadas se fijaron en solución de formaldehído amortiguado al 10% se procesaron siguiendo la técnica histológica convencional, los cortes se realizaron en la parte media, con un micrótopo rotatorio de 4 a 8 micras de grosor y se teñieron con hematoxilina y eosina.

### Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos de hembras tratadas con diferentes dosis y los datos somáticos, se aplicó un ANOVA con los paquetes estadísticos: Statistica versión 3.11 para Windows y Jandel Sigma Stat 2.0 para Windows, utilizando la prueba de Tukey.

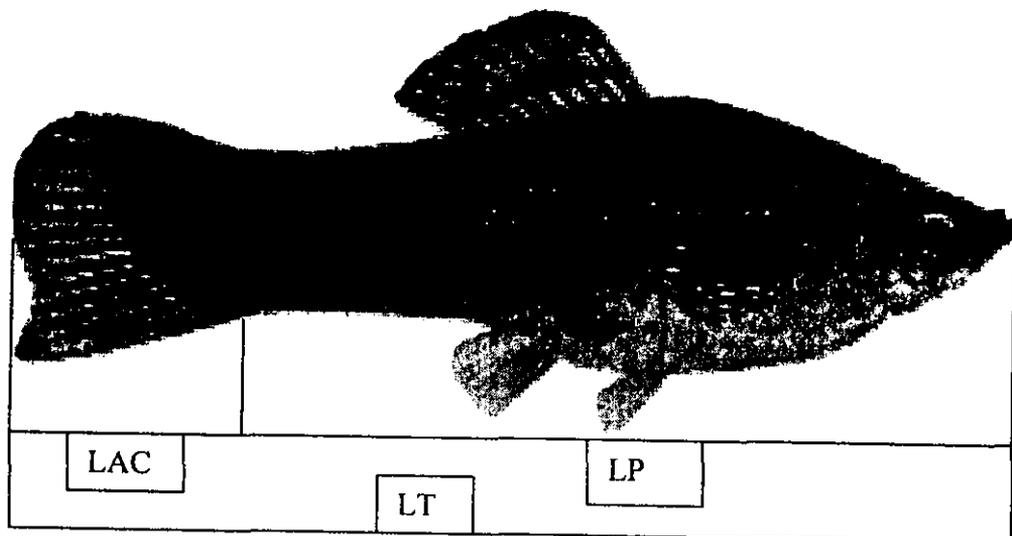
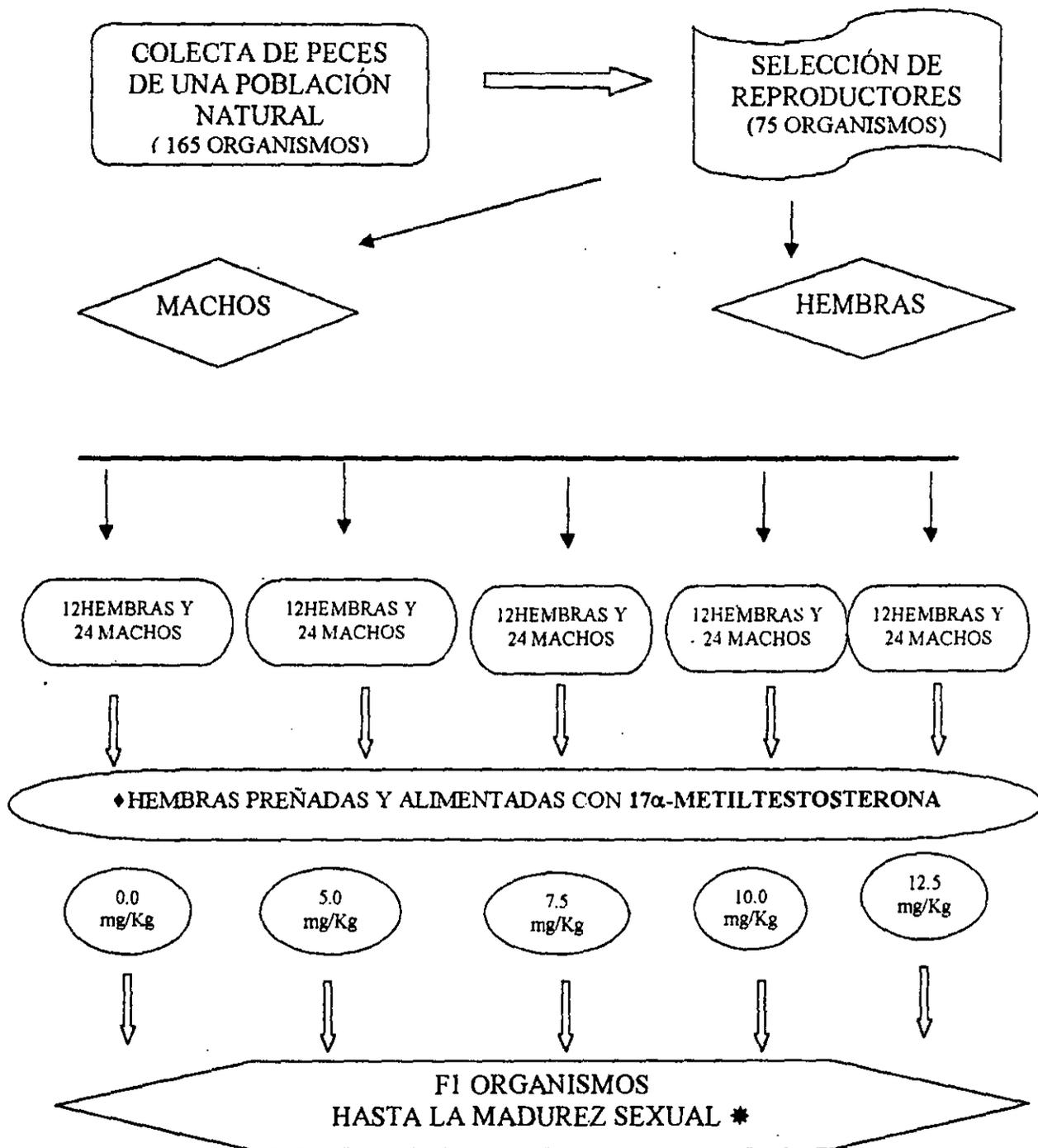


Figura 4. Medidas somáticas.

## II) Obtención de los organismos de la F1.

Los lotes experimentales tratados con el alimento hormonado hasta el nacimiento de las crías, una vez que se observaban con el abdomen totalmente abultado y de color obscuro, las hembras se separaban del acuario y se colocaban en una maternidad, dentro de otro acuario, al nacimiento de las crías estas quedaban separadas de las madres (ya que esta especie presenta canibalismo), las crías se mantuvieron en los acuarios donde nacieron y una vez que reabsorbían el saco vitelino, se alimentaban con peletizado para trucha Salmón starter hasta la madurez sexual, etapa en la cual se manifiestan los caracteres sexuales secundarios se determinó la proporción sexual y se estableció el efecto de estas dos hormonas en la inducción sexual durante el desarrollo de las gónadas.

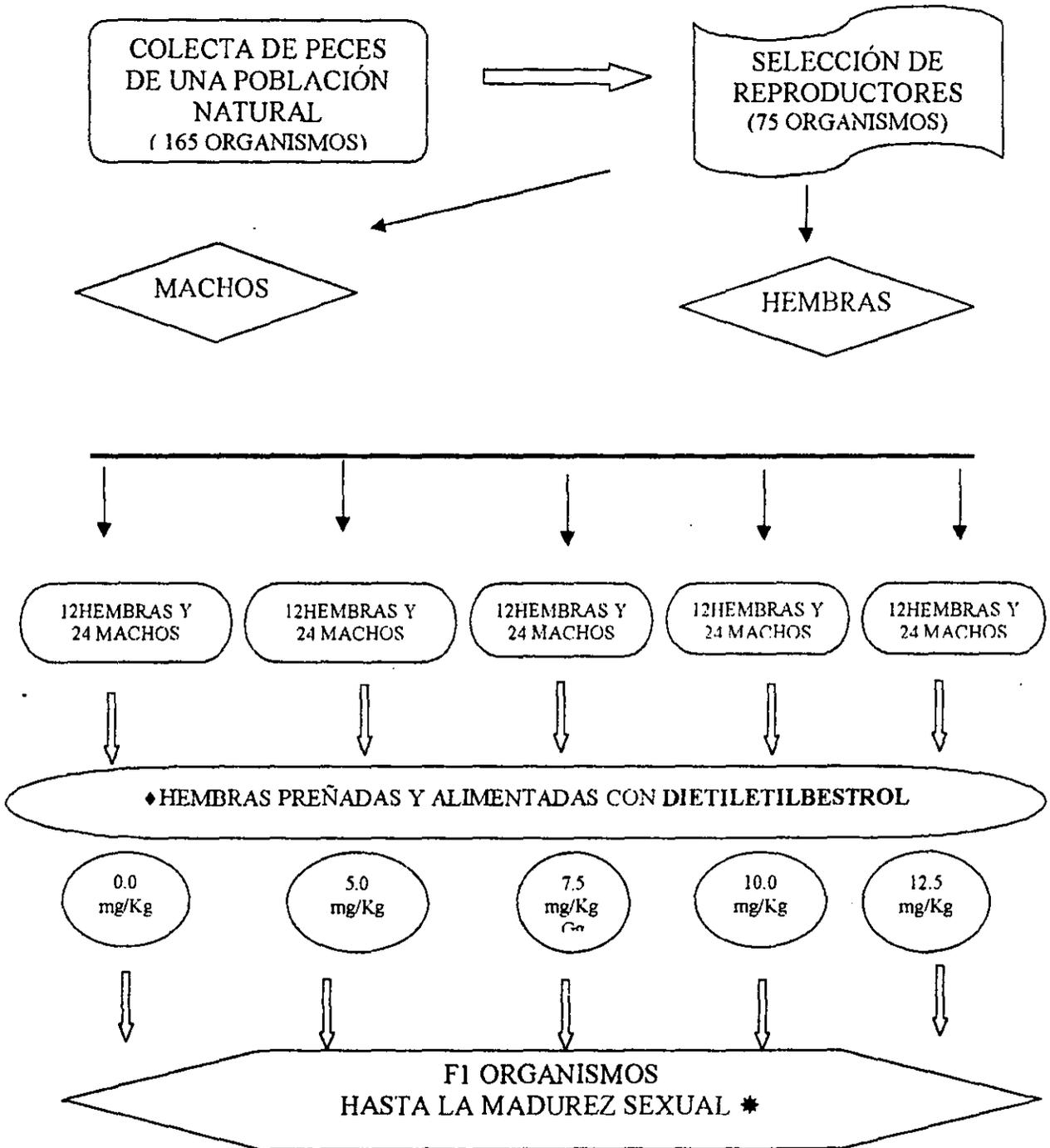
## DIAGRAMA DE FLUJO MT



- ◆ EFECTO DE LA HORMONA EN LAS HEMBRAS: MORFOLOGÍA EXTERNA, LONGITUD, PESO E HISTOLOGÍA DE LA GONADA
- \* PROPORCIÓN SEXUAL DE LOS ORGANISMOS DE LA F1.

Figura 5. Diagrama de la aplicación de MT.

# DIAGRAMA DE FLUJO DES



◆ EFECTO DE LA HORMONA EN LAS HEMBRAS: MORFOLOGÍA EXTERNA, LONGITUD, PESO E HISTOLOGÍA DE LA GONADA

\* PROPORCIÓN SEXUAL DE LOS ORGANISMOS DE LA F1.

Figura 6. Diagrama de la aplicación de DES.

## *RESULTADOS*

### EFFECTO DE LA 17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA (MT)

#### I) MEDIDAS SOMÁTICAS

Se obtuvieron los datos de medidas y peso de todos los organismos tratados, se considero la dosis de 12.5 mg/kg por su mayor efecto en la inducción de machos en los lotes experimentales.

A los 20 días de tratamiento las hembras experimentales muestran un mayor colorido, con respecto a las hembras control, se inicia el crecimiento en los radios inferiores de la aleta caudal así como los primeros radios de la aleta anal. Después de 30 días de tratamiento las hembras presentan la apariencia de los machos, con la aleta caudal desarrollada y los primeros radios de la aleta anal más gruesos y alargados, tienen la apariencia de machos pero más grandes y robustos. A los 40 días mantienen la apariencia de machos, pero con el abdomen expandido y la parte más voluminosa de color oscuro como se observan las madres control días antes del nacimiento de sus crías (tabla 4).

Tabla. 4. Medidas somáticas de las hembras, alimentadas con la dosis de 12.5mg/kg de 17 $\alpha$ -metiltestosterona / controles.

Tiempo de tratamiento (días)	Longitud Total (mm) exper/control	Longitud Patrón (mm) exper/control	Long. de la base de la aleta caudal (mm) exper/control	Peso (g) exper/control
10	60 / 45	46 / 35	17 / 9	2.78 / 1.45
10	53 / 52	44 / 43	10 / 10	1.9 / 1.81
10	69 / 49	55.5 / 39	14 / 10	3.24 / 1.6
10	66.5 / 60	51 / 46	15 / 13	2.5 / 2.16
20	64 / 59	48 / 50	20 / 9	2.57 / 4.43
20	65 / 57	47 / 44	19 / 13	2.10 / 2.09
20	62 / 64	45 / 51	17 / 12	2.43 / 3.07
20	65 / 62	50 / 45	16 / 14	3.06 / 6.63
30	66 / 65	48 / 51	20 / 16	2.81 / 3.62
30	64 / 68	47 / 55	17 / 14	2.93 / 3.92
30	67 / 63	49 / 54	21 / 12	3.0 / 3.21
30	64 / 66	48 / 52	19 / 15	4.13 / 2.91
40	86 / 75	68 / 64	24 / 17	6.43 / 5.98
40	70 / 70	55 / 55	17 / 16	3.42 / 4.42
40	82 / 67	61 / 54	22 / 15	3.87 / 3.2
40	87 / 73	50 / 52	32 / 19	2.47 / 5.24
45	97 / 90	52 / 64	44 / 24	2.15 / 4.87
45	89 / 86	57 / 70	34 / 19	4.82 / 5.73
45	86 / 82	68 / 68	29 / 18	3.54 / 4.22
45	84 / 87	61 / 57	32 / 22	3.95 / 5.94

Las hembras que fueron tratadas presentaron un desarrollo muy semejante a los controles en cuanto a crecimiento y peso, la diferencia por el efecto de la MT se observa en el alargamiento en los radios de la base en la aleta caudal, formando la espada que se presenta en los machos adultos, este alargamiento modifica la longitud total de los organismos al final del tratamiento.

#### MORFOLOGÍA EXTERNA.

Es importante hacer notar, que en todos los tratamientos, las hembras a partir de los 15 días (dosis de 12.5 mg/kg) y hasta los 25 días (dosis de 5 mg/kg) empiezan a manifestar los caracteres sexuales secundarios masculinos, como es la prolongación de los radios en la base de la aleta caudal, con los colores más intensos, así como el engrosamiento y alargamiento de los primeros radios de la aleta anal (Fig. 7), pero estos nunca se fusionan formando el gonopodio como en los machos. Las hembras tratadas se observan con el abdomen voluminoso, las gónadas bien desarrolladas, con ovocitos grandes y llenos de vitelo (Fig. 8).

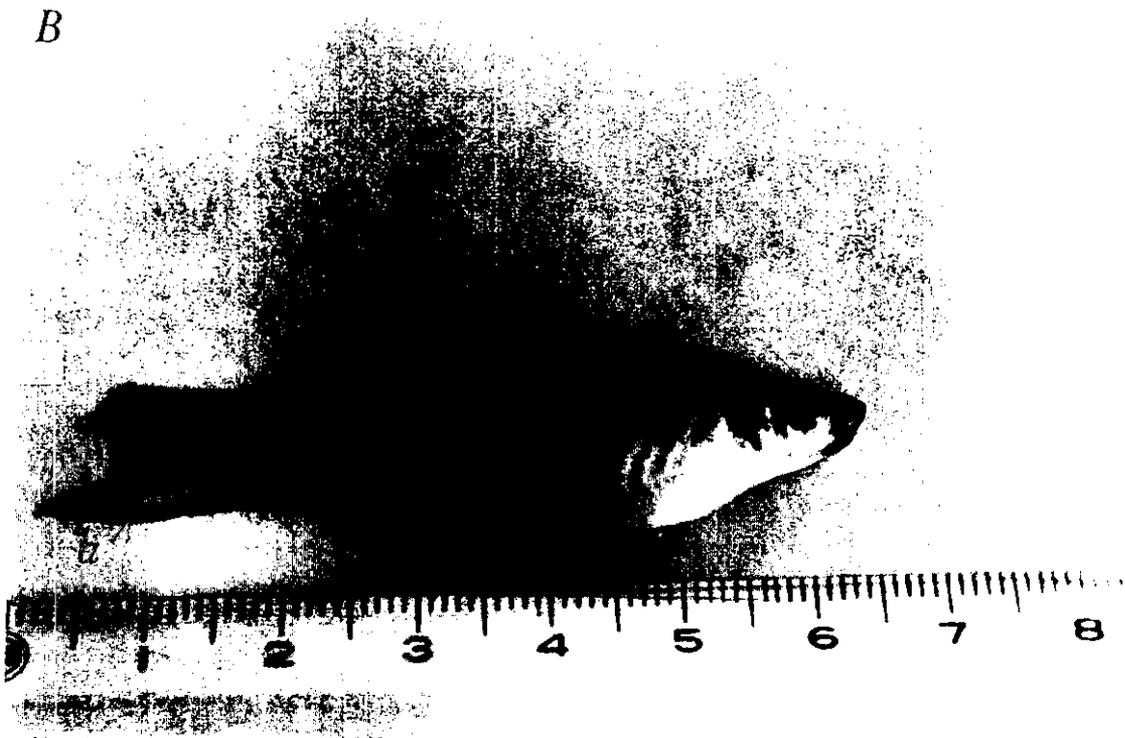
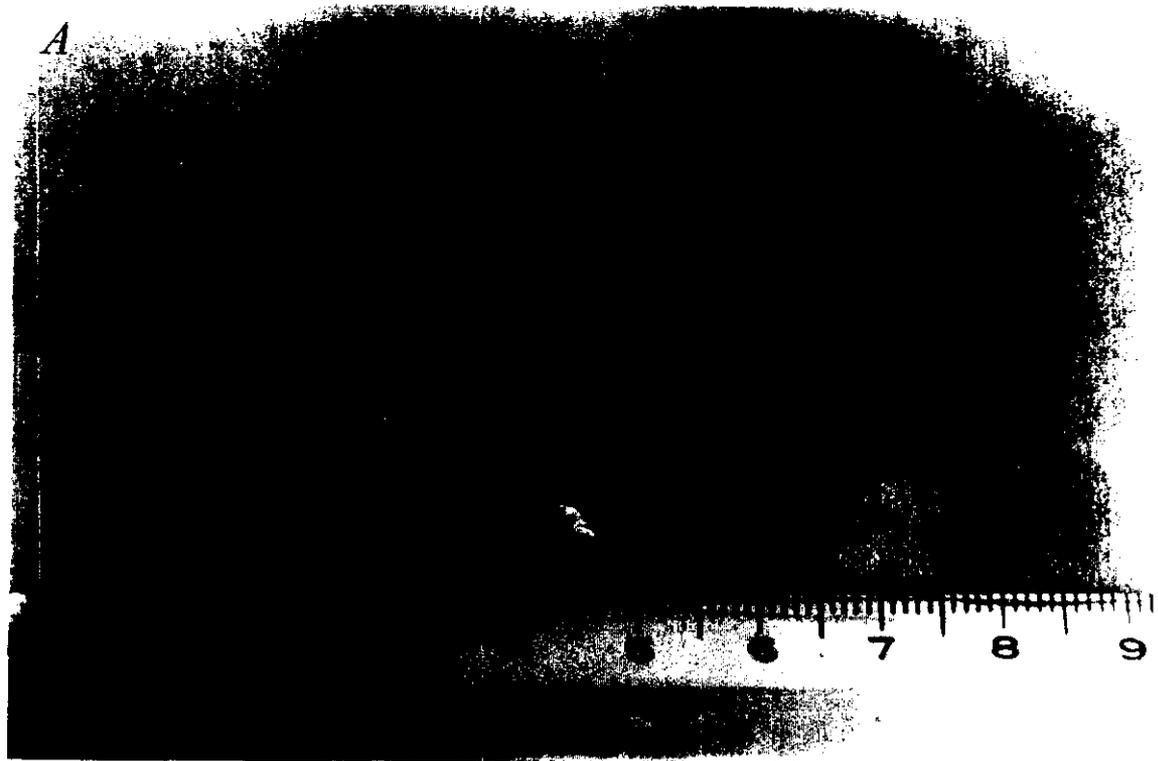


Figura 7. A) macho adulto (t) testículo bien desarrollado, B) hembra a los 30 días de tratamiento, dosis de 12.5mg/kg con  $17\alpha$ -metiltestosterona, (a) prolongación de la aleta caudal, coloración característica de macho (b) alargamiento de los primeros radios de la aleta anal.

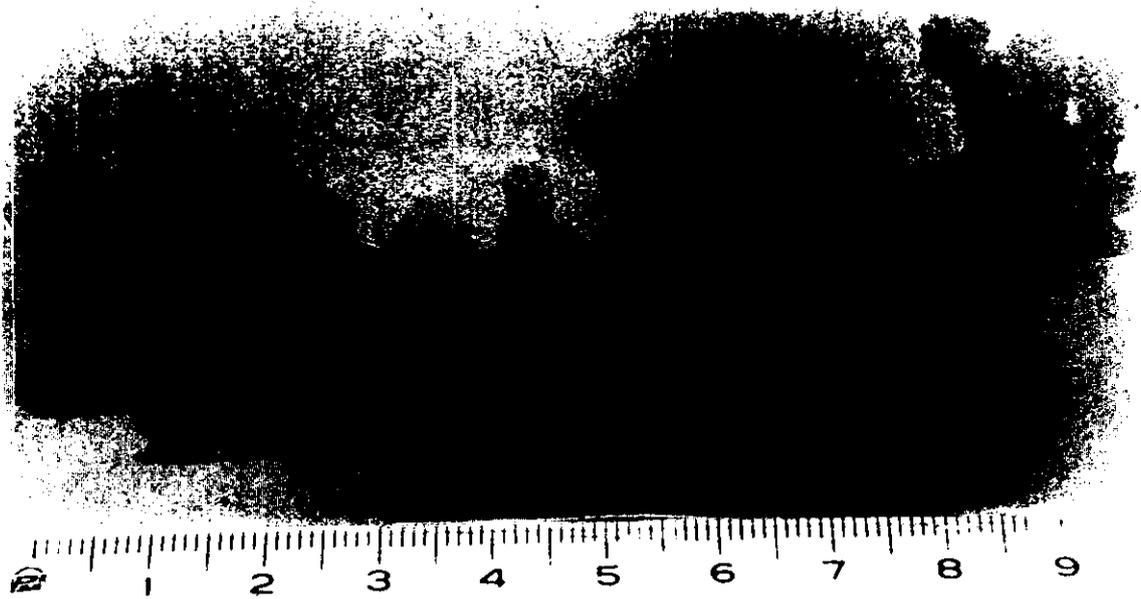


Figura 8. Hembra a los 40 días de tratamiento con la dosis de 12.5mg/kg.

Entre los 40 y 45 días las hembras en tratamiento, se separaron y se colocaron dentro de una maternidad en otro acuario, para esperar el nacimiento de las crías, estas hembras tienen toda la coloración y apariencia de los machos, pero presentan el abdomen bien desarrollado (Fig. 9).

Las hembras tratadas presentaron diferencias significativas en la longitud total (LT) y longitud caudal (LC) a los 40 y 45 días después de iniciado el tratamiento. Se indican los valores promedio y las gráficas para cada una de las medidas somáticas (Graf. 1 - 6) y del peso (Graf. 7 - 8).

Como se puede apreciar en los resultados se observan diferencias significativas (\*) en la Longitud Total ( $P < 0.05$ ) a los 40 y 45 días después de iniciado el tratamiento con respecto a los controles (Graf. 1, 2). También se obtuvieron diferencias significativas (\*) en la Longitud Caudal ( $P < 0.05$ ), a los 40 y 45 días respectivamente siendo notable el crecimiento de este parámetro con respecto a los controles (Graf. 3, 4), en la Longitud Patrón y el Peso no se presentan diferencias.

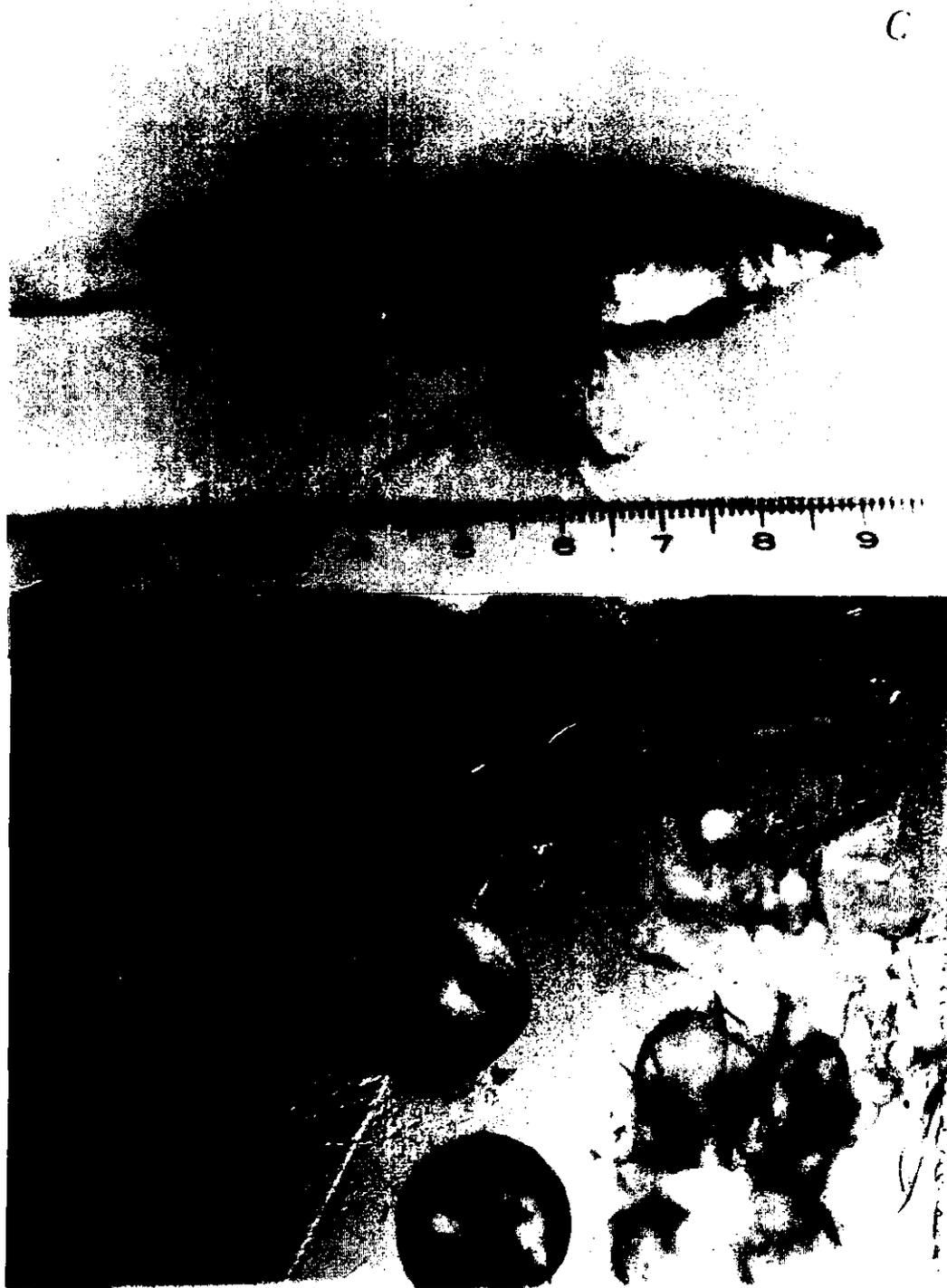
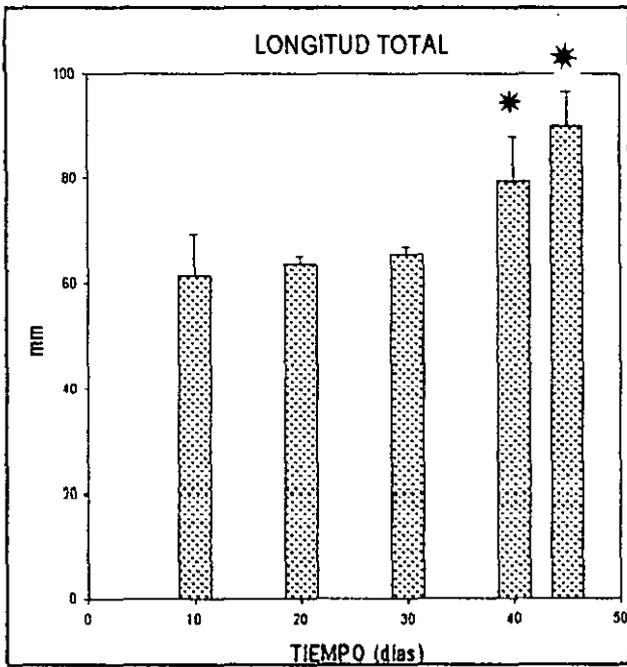
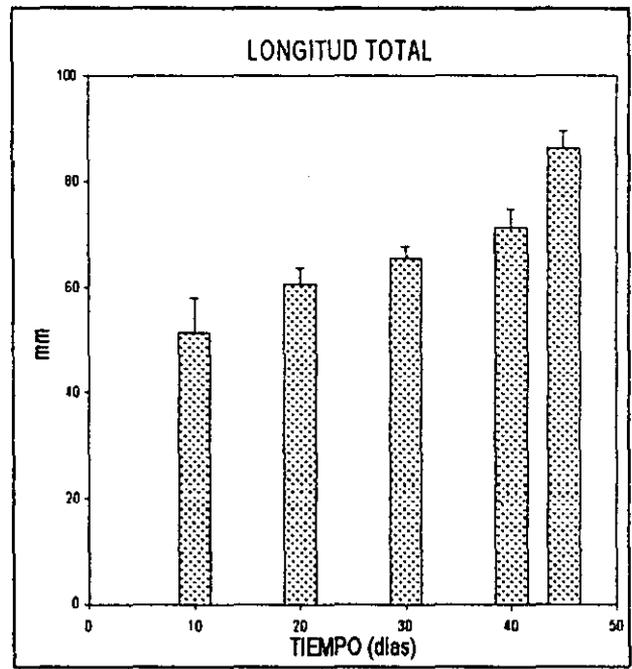


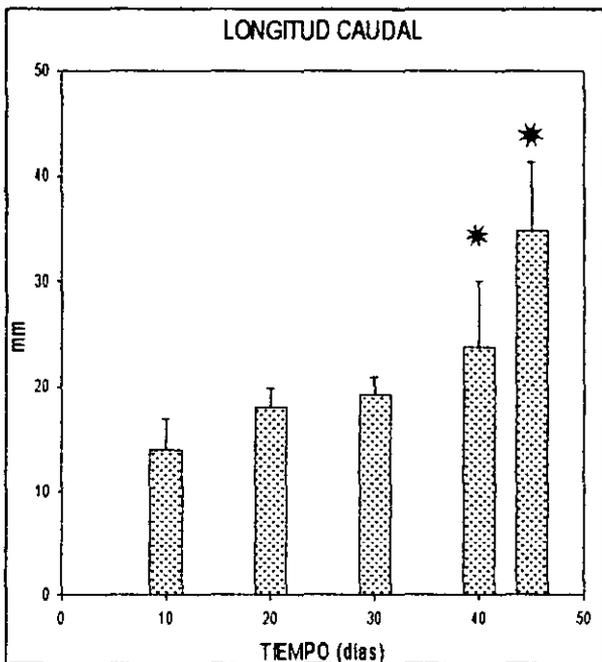
Figura 9. C) Hembra con los caracteres de macho, D) embriones en desarrollo en la gónada.



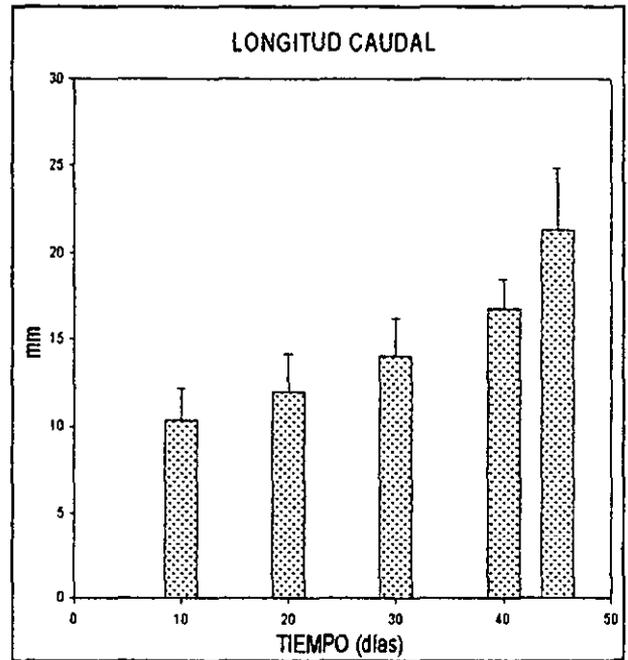
Gráfica 1. Variación de la Longitud Total 12.5mg/kg de MT.



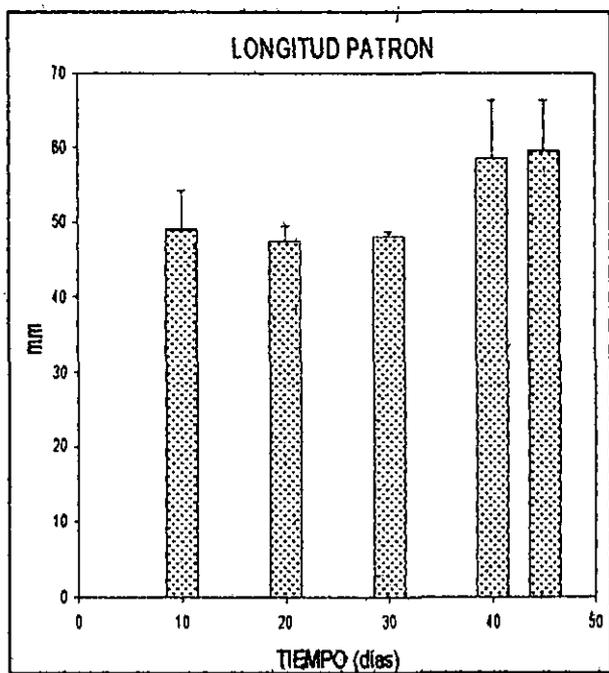
Gráfica 2. Variación de la Longitud Total de los controles.



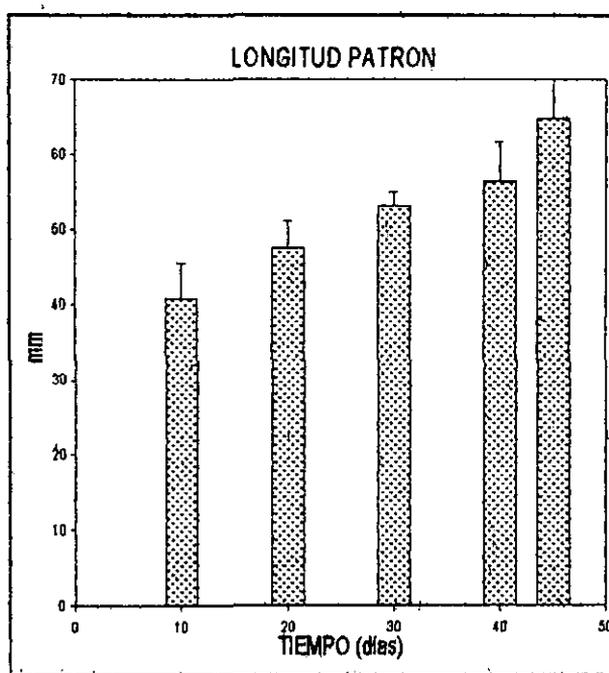
Gráfica 3. Variación de la Longitud Caudal, 12.5mg/kg de MT.



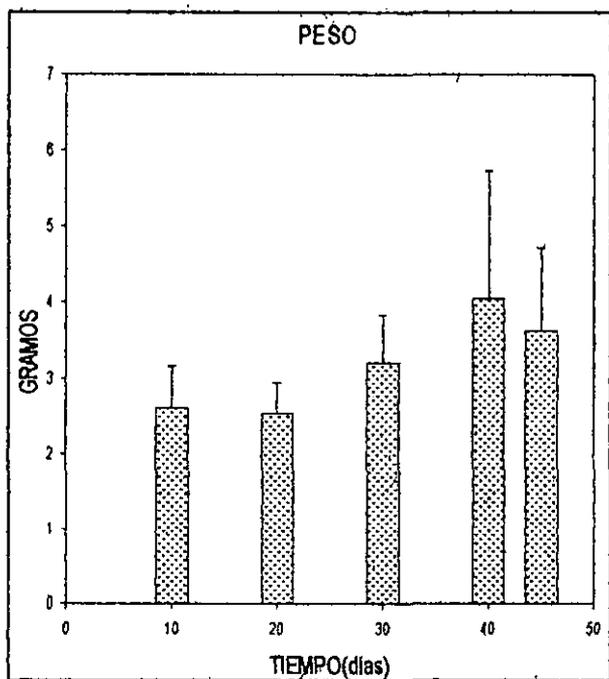
Gráfica 4. Variación de la Longitud Caudal de los controles.



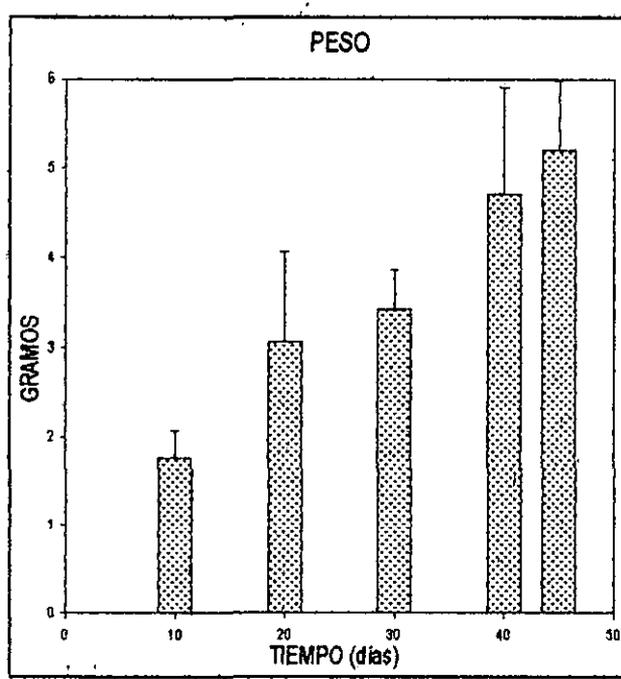
Gráfica 5. Variación de la Longitud Patrón 12.5mg/kg de MT.



Gráfica 6. Variación de la Longitud Patrón de los controles.



Gráfica 7. Variación del Peso dosis de 12.5mg/kg de MT.



Gráfica 8. Variación del Peso de los controles.

## EFEECTO DE LA MT EN LAS HEMBRAS TRATADAS

El carácter sexual secundario de los machos es la prolongación de los radios inferiores en la aleta caudal, al alimentar a las madres con este andrógeno e incrementar su concentración en el torrente sanguíneo, se empiezan a manifestar en las hembras las características de machos. La característica más evidente es el crecimiento de la aleta caudal (peces espada), teniendo al final del tratamiento una longitud de 44mm con respecto a 24mm en los controles. La Longitud Patrón (LP) presenta un crecimiento normal (Graf. 5, 6).

El peso promedio de los organismos controles se incrementa conforme avanza la gestación, en los experimentales el peso promedio al final del tratamiento disminuye, probablemente esta pérdida esté relacionada con los efectos del andrógeno en la gónada (Graf. 7, 8).

### TIEMPO DE GESTACIÓN.

En la tabla 5 se indican los tiempos promedios de gestación en los diferentes tratamientos, este rango de variación se encuentra dentro del reportado en poblaciones naturales por Tavolga (1949) que es de 38 a 54 días. Estadísticamente no presentaron diferencias significativas con respecto a los controles.

Tabla. 5. Tiempo transcurrido desde la fecundación de las hembras, hasta el nacimiento de las crías.

DOSIS (MT) (mg/kg)	TIEMPO PROMEDIO DE GESTACIÓN EN DÍAS
12.5	45
10.0	48
7.5	51
5.0	50
0.0	50

Las hembras tratadas con una mayor concentración de hormona (12.5 mg/kg) tuvieron un menor número de crías (12 a 20) y en algunas ocasiones las crías nacían muertas, mientras que las hembras control parieron de 25 a 45 crías.

## ANALISIS HISTÓLOGICO OVARIOS CONTROLES

El ovario de *X. helleri* es típico de un pez vivíparo (Fig.13), los ovocitos en maduración o crecimiento se localizan en la corteza del órgano y los inmaduros en la médula, presentan un desarrollo asincrónico. La túnica albugínea que rodea el ovario consta de tejido conectivo, es delgada y poco vascularizada. Hay poco tejido conectivo en el estroma ovárico, pero se observa la presencia de muchos vasos sanguíneos y en algunas zonas capas de músculo liso. A lo largo de todo el órgano se encuentra en la zona central un canal oviductual cuya luz está compuesta de epitelio cilíndrico ciliado, que es más alargado en la zona final del órgano donde comienza a ser oviducto (Fig. 10 ).

En el ovario de un organismo maduro se pueden observar ovocitos en todos los estadios: ovogonias, perinuclear temprano y tardío que están en la fase de reposo y de crecimiento temprano o primario, también se localizan ovocitos en la fase de crecimiento secundario o vitelogénesis (dependiente del estroma), alvéolos corticales, plaquetas y vesículas de vitelo; asimismo se presentan ovocitos atrésicos y en algunos casos embriones (Fig. 11).

Con respecto a las cubiertas celulares anexas se puede observar una capa de células de la teca alrededor del ovocito y una capa de células de la granulosa en los ovocitos previtelogénicos que al avanzar su maduración proliferan hasta alcanzar dos o tres capas de dichas células. La corona radiata se hace presente desde los ovocitos en la fase de alvéolos corticales y se va engrosando conforme avanza la maduración (Fig. 12).



Figura 10. Corte de ovario de una hembra control, donde se aprecia claramente: (CO) canal oviductual, (OM), ovocitos maduros, (Oa) ovocitos atrésicos, (Ep) epitelio cilíndrico ciliado (H-E, 40X).



Figura 11. Corte donde se aprecian diferentes estadios del desarrollo de los ovocitos de los controles: (cn) cromatina nucleolar, (pn) perinuclear temprano, (pt) perinuclear tardío, (ac) alvéolos corticales, (pl) plaquetas de vitelo, (vs) vesículas de vitelo y (VS) vasos sanguíneos (H-E, 100X).

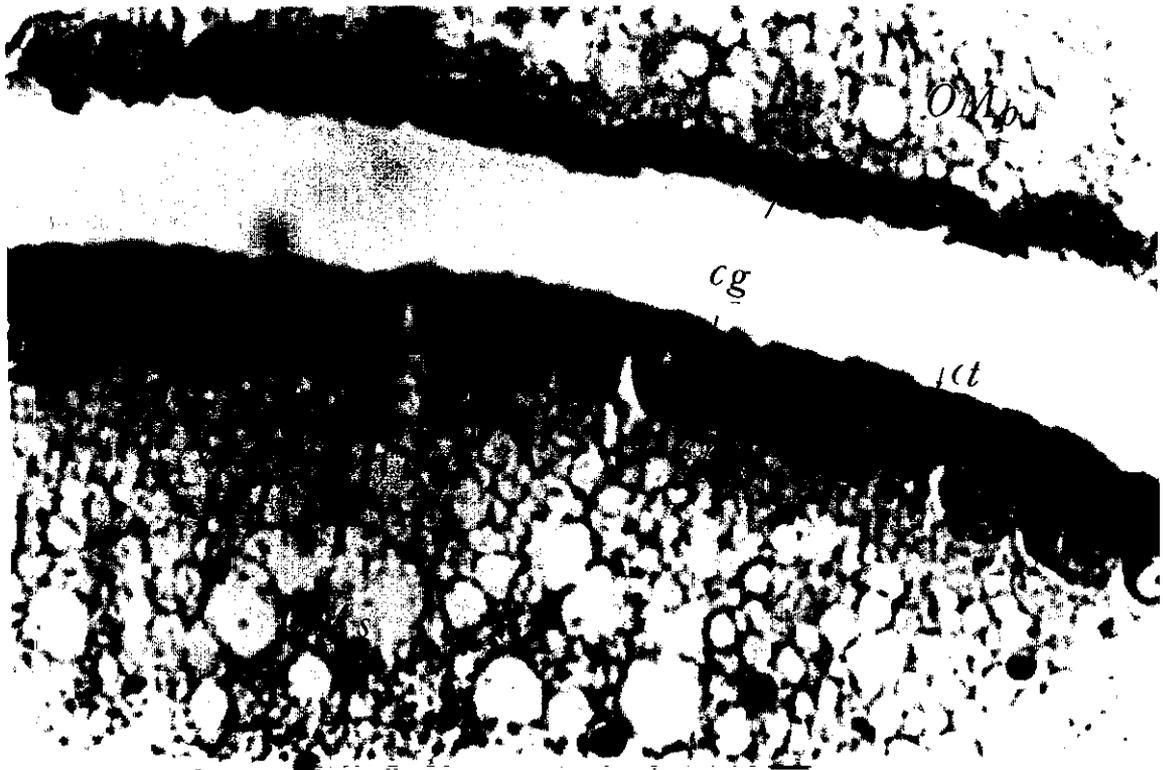


Figura 12. Cubiertas celulares de los ovocitos: (OMp) ovocito maduro primario, (OMs) ovocito maduro secundario, (cg) células de la granulosa, (ct) células de la teca, (cr) zona radiada (H-E, 200X).

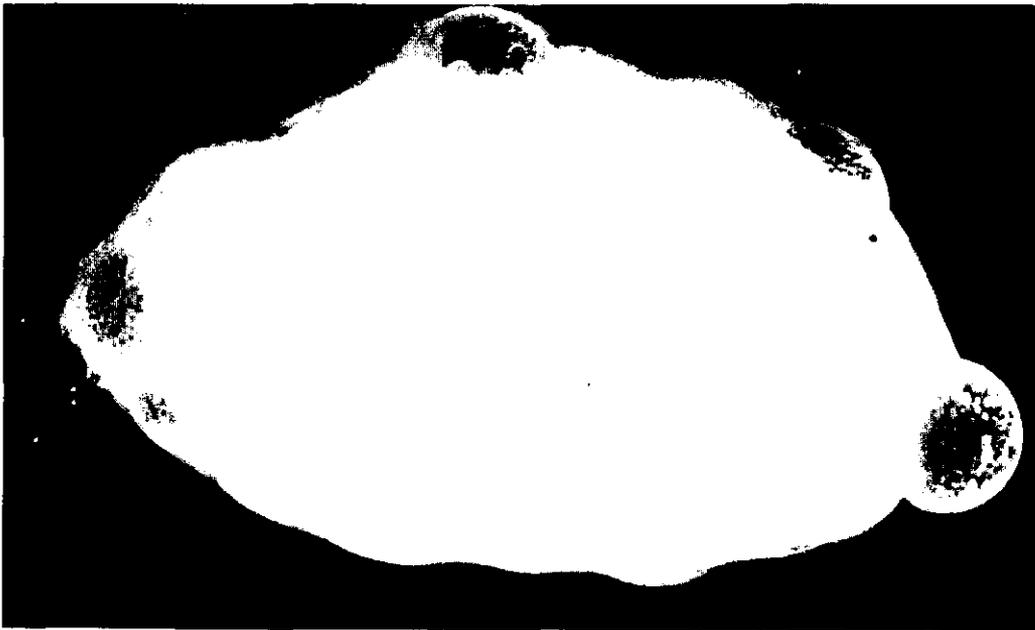


Figura 13. Ovario completo de una hembra control, se observan los ovocitos desarrollados y llenos de vitelo.

## DAÑOS PROVOCADOS POR LA APLICACIÓN DE 17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA

Se realizaron cortes histológicos de las gónadas de los peces tratados con las diferentes dosis. Se presentan los cortes y las alteraciones en la dosis de 12.5mg/kg ya que en estas gónadas los procesos degenerativos son más evidentes que en las otras dosis.

En los ovarios se presentan alteraciones con una gran cantidad de atresias foliculares y degeneración celular (Fig. 14) que se pueden identificar por la cromatolisis de los núcleos, contracción y disolución del citoplasma en los ovocitos, invasión por parte de los macrófagos (Fig. 15), como manifestación inflamatoria, desprendimiento de la membrana basal, cambios en afinidad tintórea, procesos de vacuolización, reabsorción del vitelo y muerte de los ovocitos (Fig. 16), también se observa que las células de la granulosa se hipertrofian incrementando el número de capas, y hay un aumento del aporte sanguíneo (Fig. 17).

La condición general se puede considerar necrosis ovárica severa, con hipertrofia de células de la granulosa como efecto tóxico.

Estas alteraciones en las gónadas probablemente están afectando a las hembras durante todo el tratamiento y en los últimos días se refleja en la pérdida de peso en los organismos experimentales, siendo los más afectados los de la dosis más alta (12.5mg/kg).



Figura 14. Ovario con ovocitos atrésicos(OA) o degenerados, desprendimiento de las cubiertas (dc) celulares del ovocito, tratada con la dosis de 12.5 mg/kg de MT (H-E, 100X).

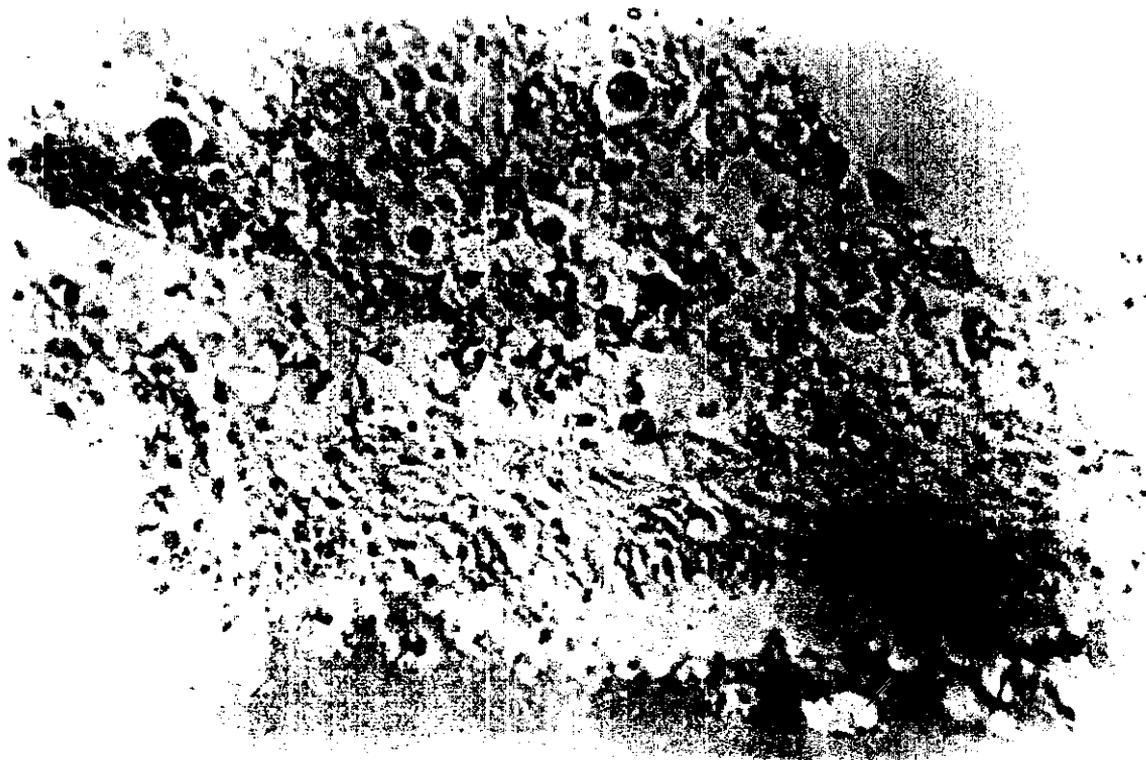


Figura 15. Procesos fagocitarios en pared folicular, presencia de macrófagos (M), eritrocitos (E) y vacuolas (V), tratada con la dosis de 12.5 mg/kg de MT (H-E, 200X).



Figura 16. Ovocito donde se observa la ruptura de la membrana nuclear (mn), tratada con la dosis de 12.5 mg/kg de MT (H-E, 100X).



Figura 17. Ovario con una gran cantidad de ovocitos pequeños y degenerados (Od), zonas hemorrágicas (zh), tratado con la dosis de 12.5 mg/kg de MT.

## II) PROPORCIÓN SEXUAL .

De los experimentos realizados alimentando a las hembras preñadas con la hormona  $17\alpha$ -metiltestosterona, se obtuvieron un total de 978 peces de la generación F1, de los cuales la mayor parte de la población fueron machos (tabla 6).

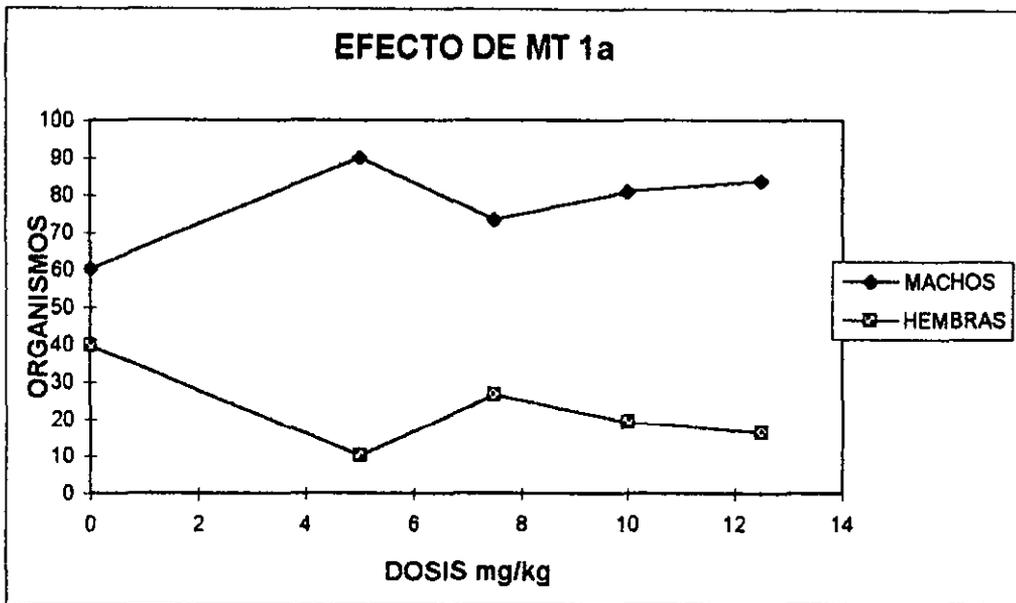
El efecto de la MT en las hembras fue notable, a los 15 días de tratamiento se observaron los cambios en morfología; se alargan los radios inferiores de la aleta caudal y los primeros radios de la aleta anal, su coloración se torno más brillante y cuando estaban a punto de parir tomando la apariencia de machos con el abdomen muy voluminoso. Al cuantificar los machos y las hembras de la generación F1, se aprecia en cada uno de los tratamientos como presenta un efecto directo en la masculinización de peces, la dosis más alta es la que induce una mayor cantidad de machos.

Tabla. 6. Población total de peces de la F1, desarrollo de machos y hembras en los tres lotes.

DOSIS (MT) (mg/kg)	% MACHOS			% HEMBRAS		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
0	60.4	20.8	35.5	39.6	79.6	64.5
5	90	59.7	61.9	10	40.3	38.1
7.5	73.5	86.3	87.8	26.5	13.17	12.2
10	80.9	91	78.4	19.1	9	21.6
12.5	83.7	81.5	91.9	16.3	28.5	8.1

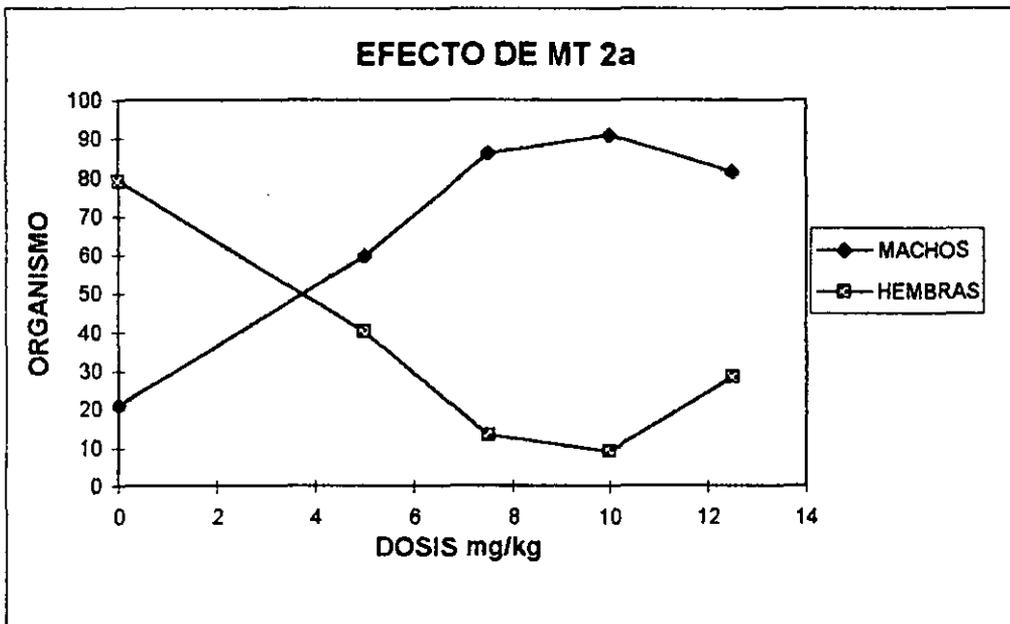
El efecto de este andrógeno en la inducción del sexo en las crías, de los tres lotes experimentales se muestra en las gráficas 9, 10 y 11.

El número de machos de los controles fué mayor, debido a que las hembras tratadas eran muy jóvenes ( cinco meses de edad), las crías al nacimiento fueron escasas y una gran cantidad de éstas nacieron muertas.



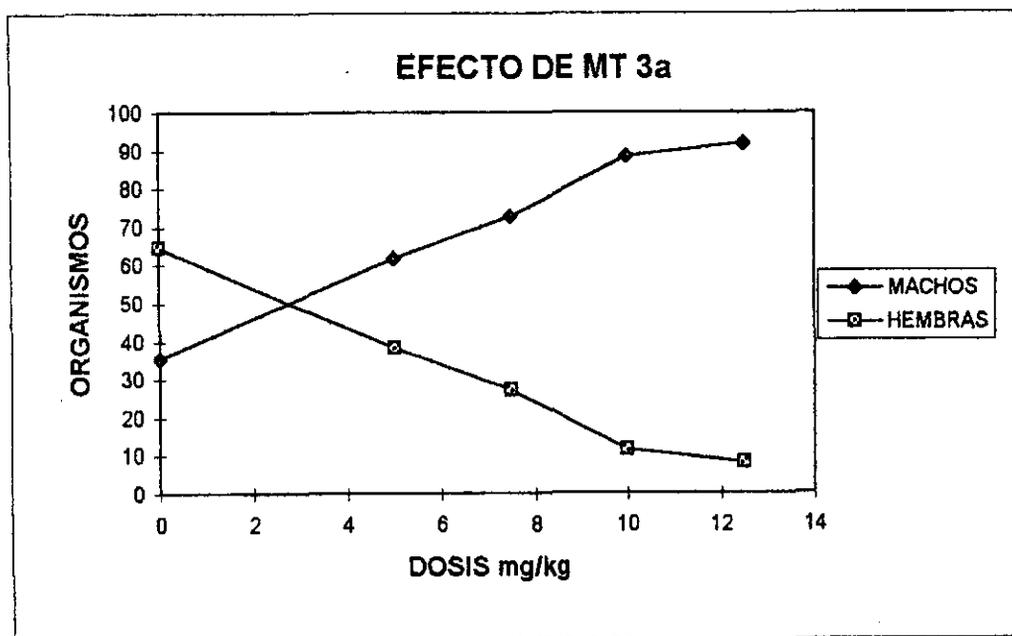
Gráfica. 9. Relación obtenida del primer lote experimental de la F1.

Para el segundo lote se seleccionaron las hembras más grandes, (seis meses de edad) la producción de crías fue mayor y el efecto del andrógeno en las diferentes dosis indujo un número mayor de machos, observándose una disminución con la dosis de 12.5mg/kg .



Gráfica 10. Relación obtenida del segundo lote experimental de la F1.

El efecto de la MT en el tercer lote se aprecia claramente como se incrementa el número de machos producidos con relación al incremento de las dosis. En ambientes naturales Milton *et al* (1983) reporta una proporción sexual hembra macho de 2.1:1.



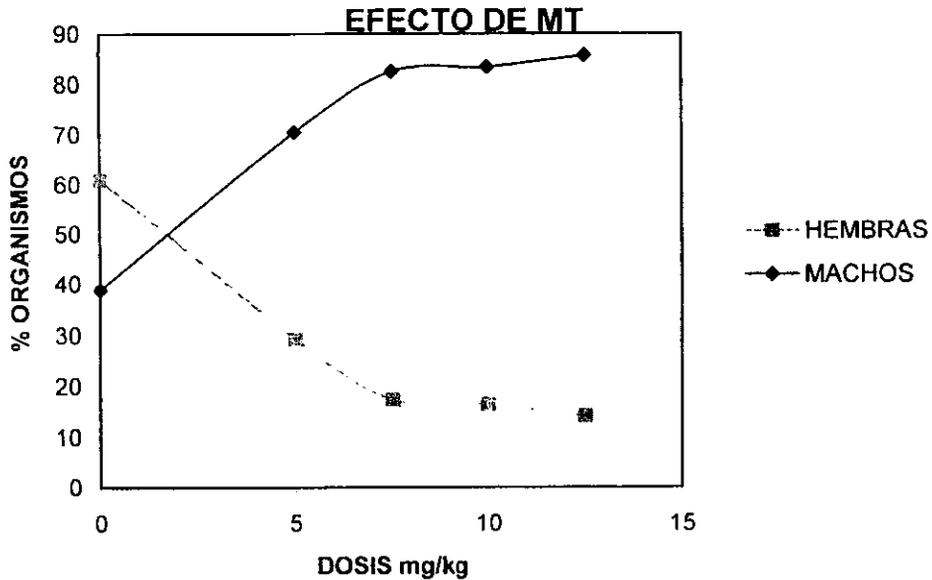
Gráfica 11. Relación obtenida del tercer lote experimental de la F1.

Considerando los resultados de los tres lotes experimentales de las crías (F1) y la manifestación sexual se obtuvo un porcentaje total (tabla 7).

Tabla. 7. Porcentaje promedio de inducción sexual, por tratamiento en la F1.

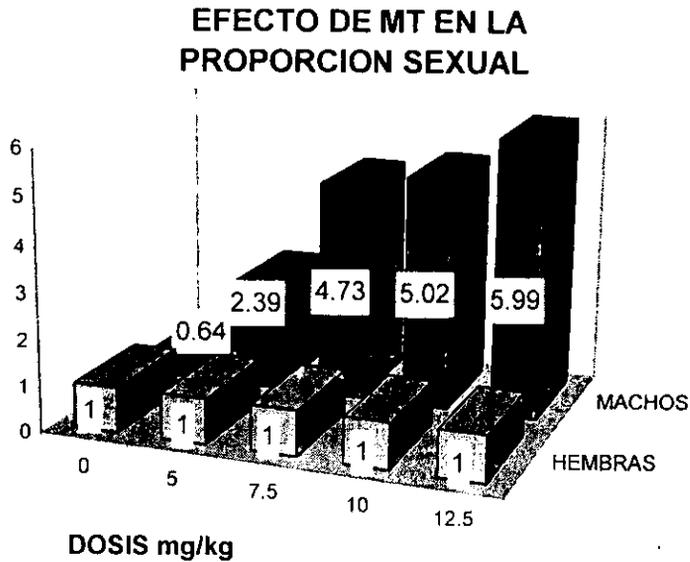
DOSIS (MT) Mg/kg	%MACHOS	%HEMBRAS
0	38.9	61.1
5	70.53	29.47
7.5	82.53	17.46
10	83.4	16.6
12.5	85.7	14.3

Las dosis de 10 y 12.5 mg/kg tuvieron un efecto mayor en la inducción sexual de machos en las crías, se puede apreciar un notable aumento desde la primera dosis (5mg/kg) (Graf. 12). Los resultados obtenidos en los tres experimentos fueron analizados estadísticamente comparando los controles con respecto a las diferentes dosis, los organismos tratados con 7.5, 10.0 y 12.5mg/kg presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



Gráfica 12. Relación total de la generación F1.

La proporción sexual hembra:macho de la F1 observada en los controles fué de 1: 0.64, en la Graf. 13 se compara la proporción sexual, hembra macho determinada por el efecto de la hormona  $17\alpha$ -metilttestosterona durante los procesos de diferenciación de la gónada en la etapa embrionaria.



Gráfica 13. Proporción sexual, del total de organismos pertenecientes a la generación F1.

## EFFECTO DE LA DIETILETILBESTROL (DES)

### I) MEDIDAS SOMÁTICAS.

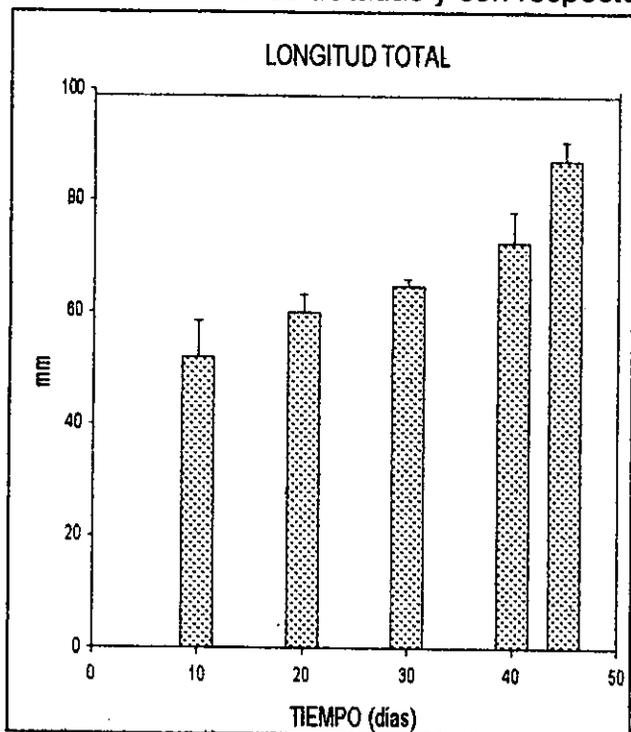
Se obtuvieron los datos de longitud y peso de los organismos experimentales / controles, se presentan los datos de la dosis de 12.5 mg/kg (tabla 8), así como las características de las gónadas.

Los valores promedio de los parámetros de longitud (LT, LP, LAC) y peso de los organismos experimentales no presentaron diferencias con respecto a los controles, las hembras gestantes incrementan su talla y peso durante esta etapa, y mantienen un crecimiento constante durante toda su vida.

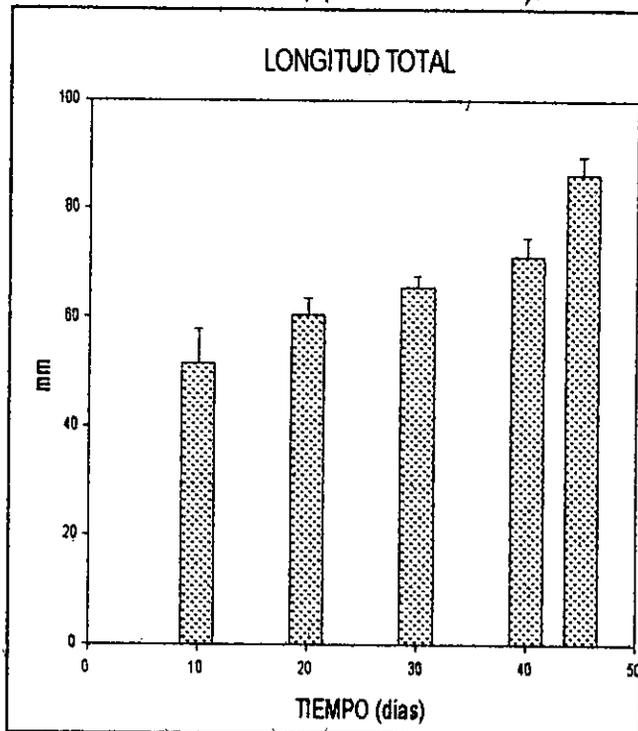
Tabla. 8. Medidas somáticas de las hembras experimentales / controles.

Tiempo de tratamiento (días)	Longitud Total (mm) expe/controles	Longitud Patrón (mm) expe/controles	Long. de la base de la aleta caudal (mm) expe/controles	Peso (g) expe/controles
10	46 / 45	36 / 35	9 / 8	1.34 / 1.45
10	52 / 52	43 / 42	10 / 10	1.81 / 1.86
10	49 / 49	39 / 39	9.5 / 10	1.60 / 1.58
10	61 / 60	47 / 46	13 / 12	2.19 / 2.16
20	59 / 59	51 / 50	9 / 9	4.43 / 4.21
20	56 / 57	44 / 46	13 / 14	1.97 / 2.09
20	63 / 64	51 / 50	12 / 12	3.07 / 3
20	62 / 62	45 / 45	14 / 14	2.63 / 2.75
30	65 / 65	51 / 52	16 / 17	3.63 / 3.62
30	65 / 68	53 / 55	14 / 14	3.92 / 4
30	63 / 63	54 / 53	11 / 12	3.21 / 3.32
30	66 / 66	52 / 52	15 / 15	2.91 / 2.89
40	80 / 75	64 / 65	20 / 17	6.01 / 5.98
40	70 / 70	55 / 54	16 / 16	4.42 / 5.98
40	67 / 67	51 / 52	15 / 15	3.20 / 4.42
40	73 / 72	54 / 64	19 / 19	5.24 / 3.2
45	82 / 90	61 / 70	20 / 24	3.87 / 5.24
45	86 / 85	70 / 68	19 / 19	5.73 / 4.87
45	84 / 82	68 / 57	18 / 20	4.08 / 5.73
45	73 / 87	57	21 / 22	5.51 / 5.94

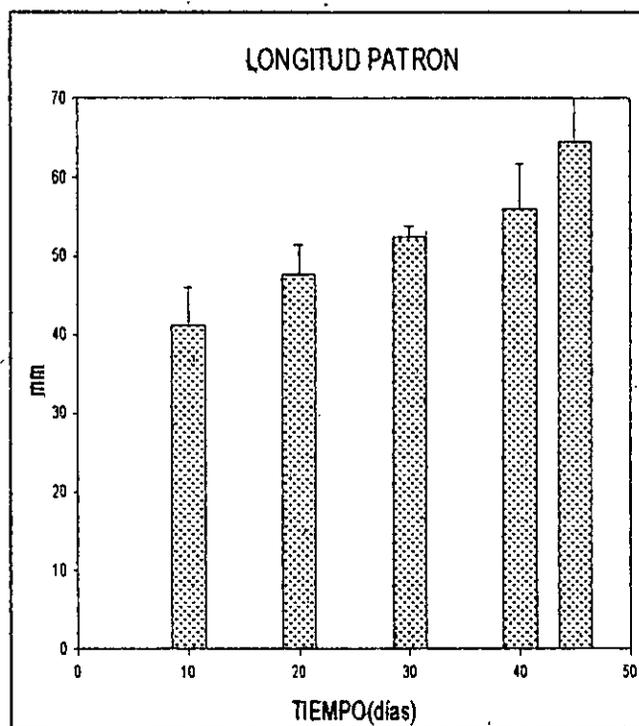
Se indican los valores promedio de la longitud total, patrón, caudal y peso de las hembras tratadas y con respecto a las hembras control, (Graf. 14 al 22).



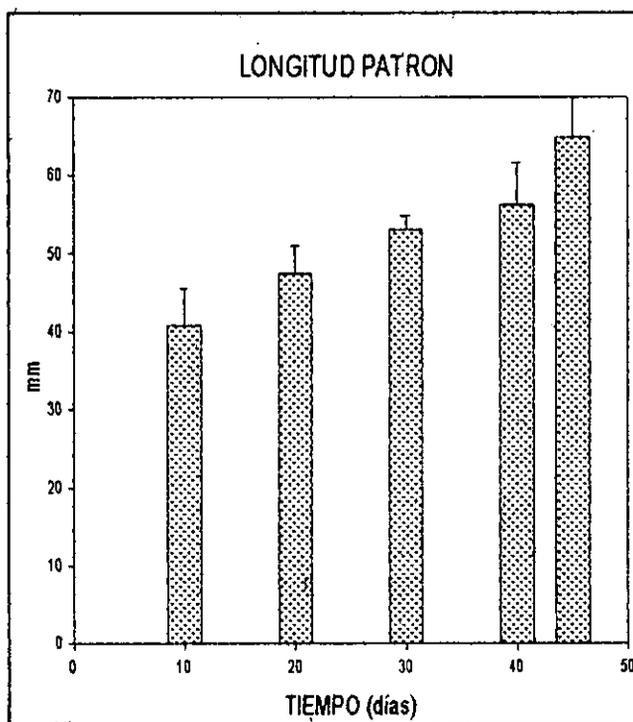
Gráfica 14. Variación de la Longitud Total 12.5mg/kg de DES.



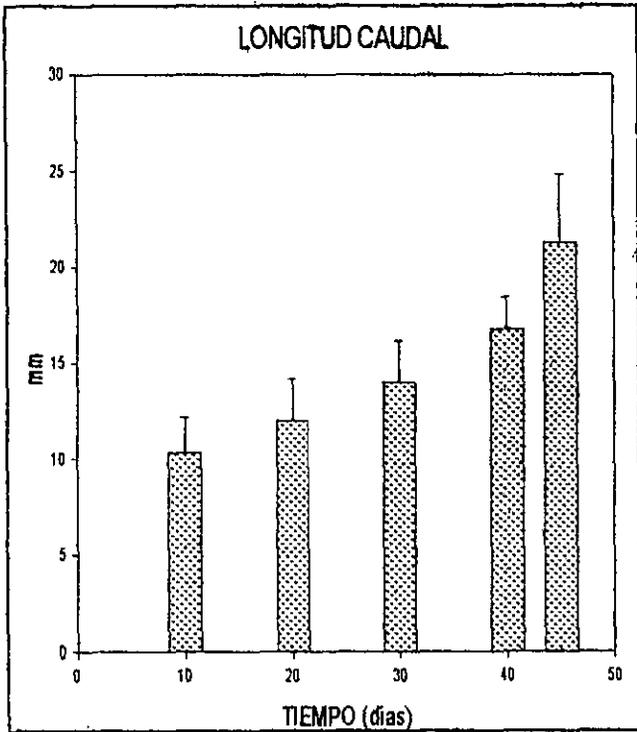
Gráfica 15. Variación de la Longitud Total de los controles.



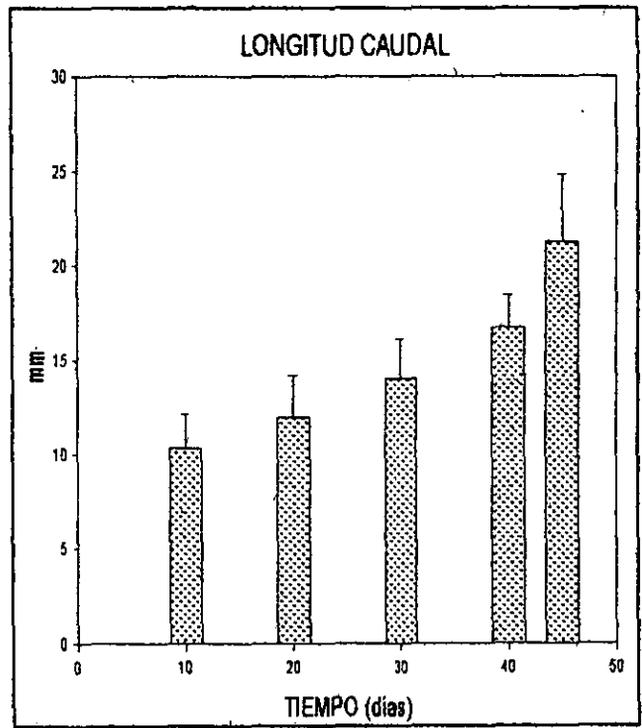
Gráfica 16. Variación de la Longitud Patrón, 12.5mg/kg de DES.



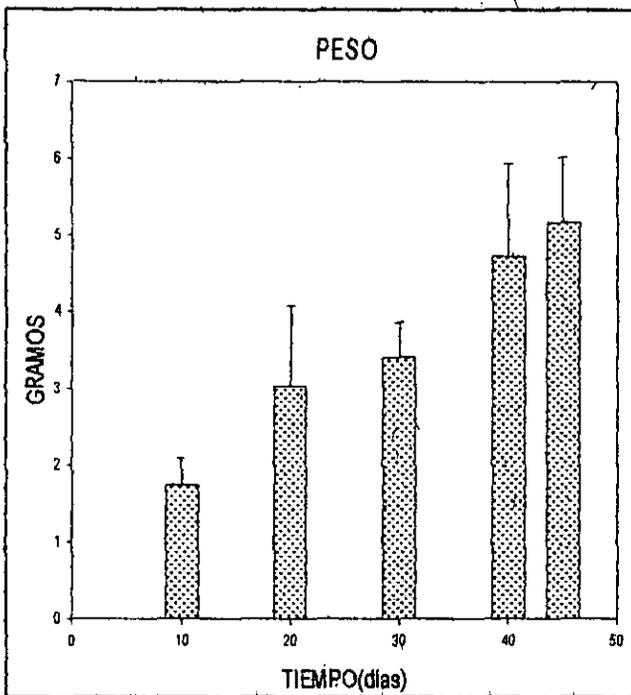
Gráfica 17. Variación de la Longitud Patrón de los controles.



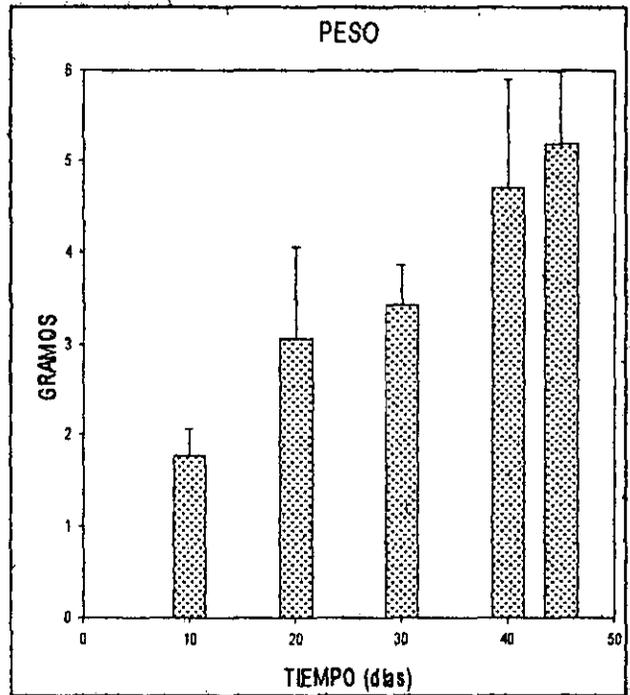
Gráfica 18. Variación de la Longitud Caudal ,12.5mg/kg de DES.



Gráfica 19. Variación de la Longitud Caudal de los controles.



Gráfica 20. Variación del Peso 12.5mg/kg de DES.



Gráfica 21. Variación del Peso de los controles.

Como se puede apreciar en los resultados no se observan diferencias en los parámetros somáticos.

## MORFOLOGÍA EXTERNA

Durante el tiempo de experimentación (50 a 37 días) no se observaron cambios en la morfología externa de las hembras, conservándose el mismo patrón de coloración que las hembras control (Fig. 18).

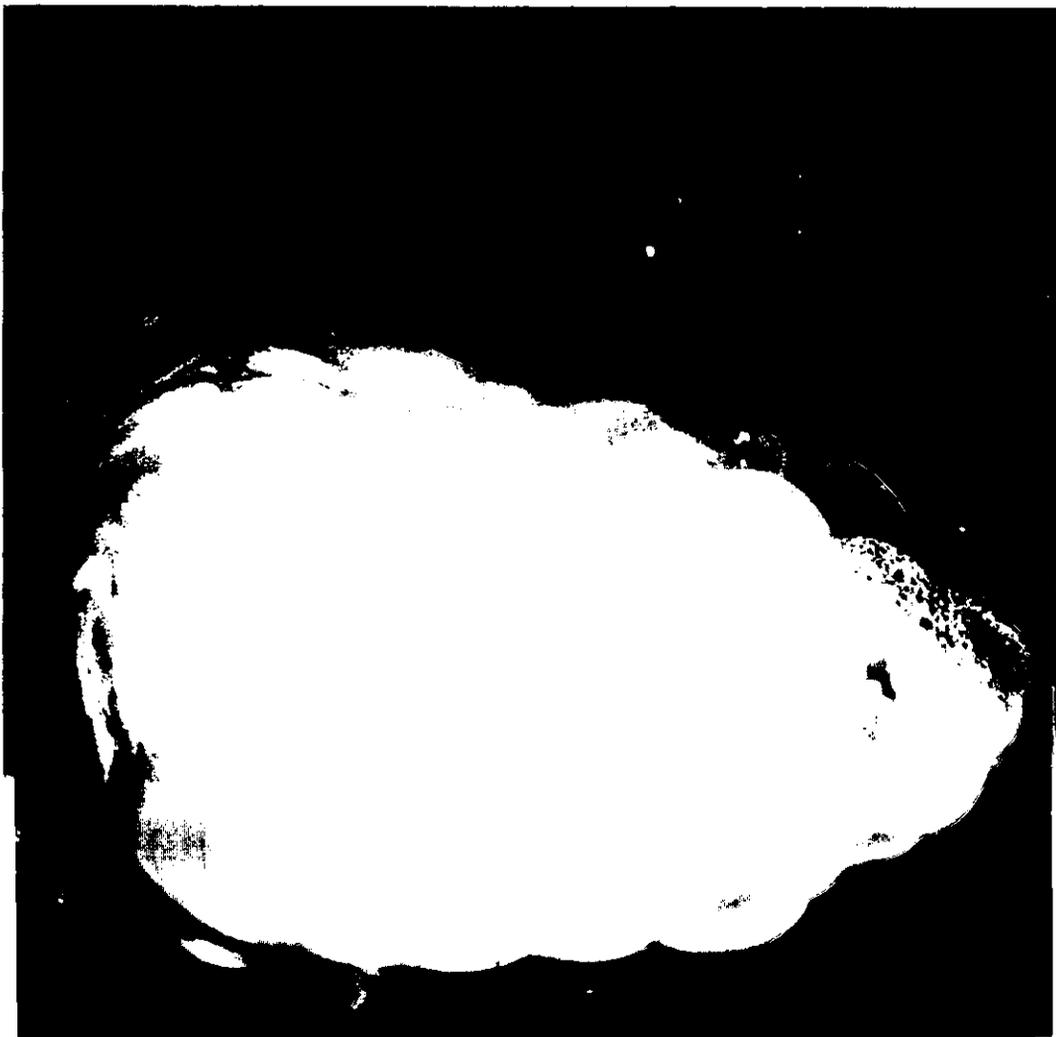


Figura 18. La gónada de una hembra tratada se observa que muestra un desarrollo similar, a la gónada de una hembra control, con ovocitos de color amarillo y gran cantidad de vitelo.

## COMPORTAMIENTO

En el comportamiento de esta especie se observó un marcado territorialismo, los organismos se agruparon por jerarquías tanto de machos como de hembras. un macho se hace notar dominante por su esbeltez una aleta caudal bien desarrollada y un mayor colorido siendo el más vistoso en comparación con los otros machos. Durante el cortejo el macho nada hacia adelante y hacia atrás, moviéndose constantemente y exhibiendo su aleta caudal a la hembra, tratando de mantenerla en un solo lugar para poderla fecundar, este macho trata de perseguir a todas las hembras para fecundarlas y mantenerlas alejadas de los otros machos. Al momento de alimentar a los peces en un solo lugar se observa que prevalece la dominancia de este pez, cuando se retiran los machos de la pecera la hembras son territoriales, generalmente es la más grande, la que controla al grupo.

## TIEMPO DE GESTACIÓN

En la tabla 9 se presentan los tiempos promedio de gestación, en cada uno de los tratamientos aplicados, este rango de variación se encuentra dentro del reportado en poblaciones naturales que es de 38 a 54 días. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles.

Tabla. 9. Tiempo transcurrido desde la fecundación de las hembras, hasta el nacimiento de las crías.

DOSIS (mg/kg)	TIEMPO PROMEDIO DE GESTACIÓN EN DÍAS
12.5	37
10.0	37.66
7.5	37.66
5.0	41.33
0.0	50

Las hembras tratadas con una mayor concentración de hormona (12.5 mg/kg) tuvieron un menor número de crías (12 a 20 ) y en algunas ocasiones las crías nacían muertas, mientras que las hembras control parieron de 25 a 45 crías.

## DAÑOS PROVOCADOS POR LA APLICACIÓN DE DIETILETILBESTROL

Se realizó un análisis histológico de las gónadas de los organismos tratados, comparándolas con los controles para poder identificar alteraciones por efecto del estrógeno.

Se observaron diferencias en los cortes de las gónadas de los peces tratados con las diferentes dosis siendo más evidentes las alteraciones en las gónadas de los peces tratados con la dosis de 12.5mg/kg de DES.

Los ovarios de los organismos tratados presentan una gran cantidad de ovocitos atrésicos, también se puede observar degeneración oofóretica con presencia de melanina en el citoplasma (Fig. 19). Las células de la granulosa se hipertrofian aumentando hasta 17 capas en los ovocitos vitelogénicos, pudiéndose observar cambios en la conformación del vitelo, su citoplasma pierde afinidad tintórea que está indicando necrosis (Fig. 20 y 21). Sin embargo, en los ovarios donde se lograron observar embriones, éstos fueron normales (Fig. 22).

Se puede considerar necrosis ovárica severa, con hipertrofia de células de la granulosa de efecto tóxico farmacológico.

En morfología las hembras tratadas no presenta muchas diferencias con respecto a los controles. Las gónadas de los experimentales presentan una gran cantidad de ovocitos pequeños de color blanco con un incremento en la irrigación sanguínea, es probable que esta condición este afectando el desarrollo de todo el organismo y al final del tratamiento se refleje en la perdida de peso y en la disminución de las crías que se desarrollan.

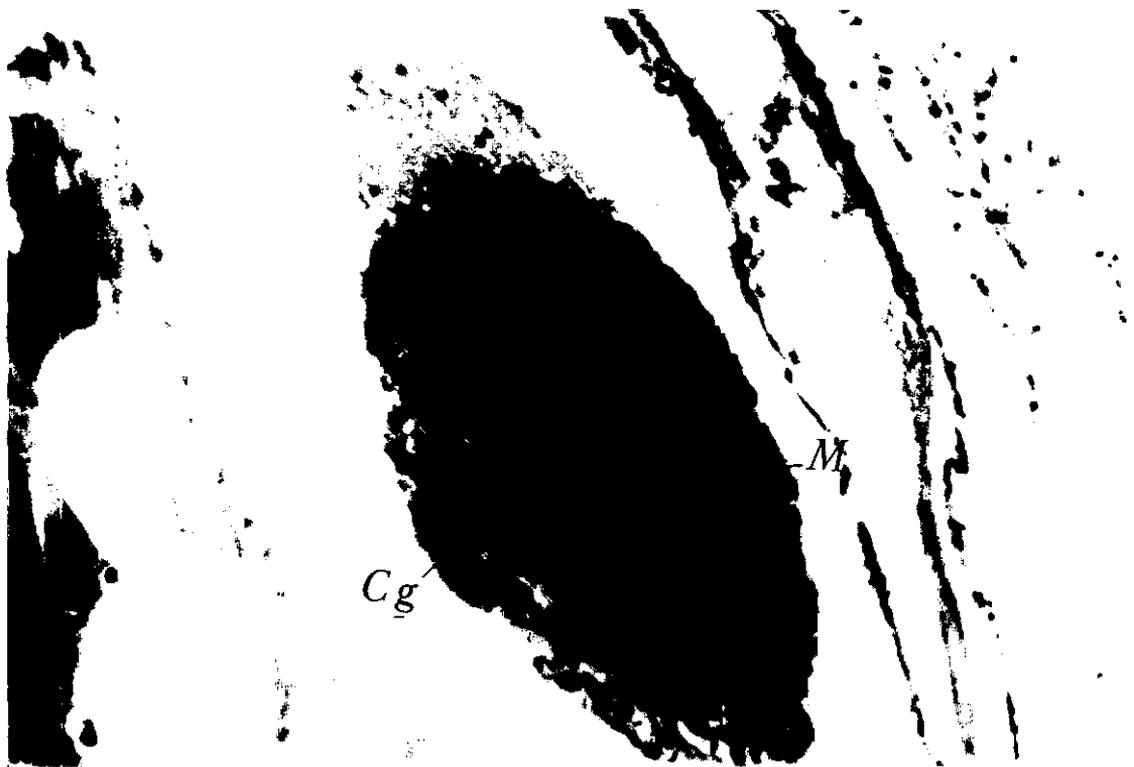


Figura 19. Ovocito de una hembra tratada con la dosis de 12 mg/kg de DES, degeneración oofóretica, con acumulación de melanina (M), se puede observar que las células de la granulosa (Cg) no se ven afectadas (H-E, 100X).



Figura 20. Ovocito con tratamiento de 12.5 mg/kg de DES, se observan alteraciones en el citoplasma (C) con hipertrofia en las células de la granulosa (Hg) (H-E, 100X).



Figura 21. Ovocito con tratamiento de 12.5 mg/kg de DES, se observan ovocitos sanos (Os), ovocitos degenerados (Od) y ovocitos atrésicos (Oa) (H-E, 40X).

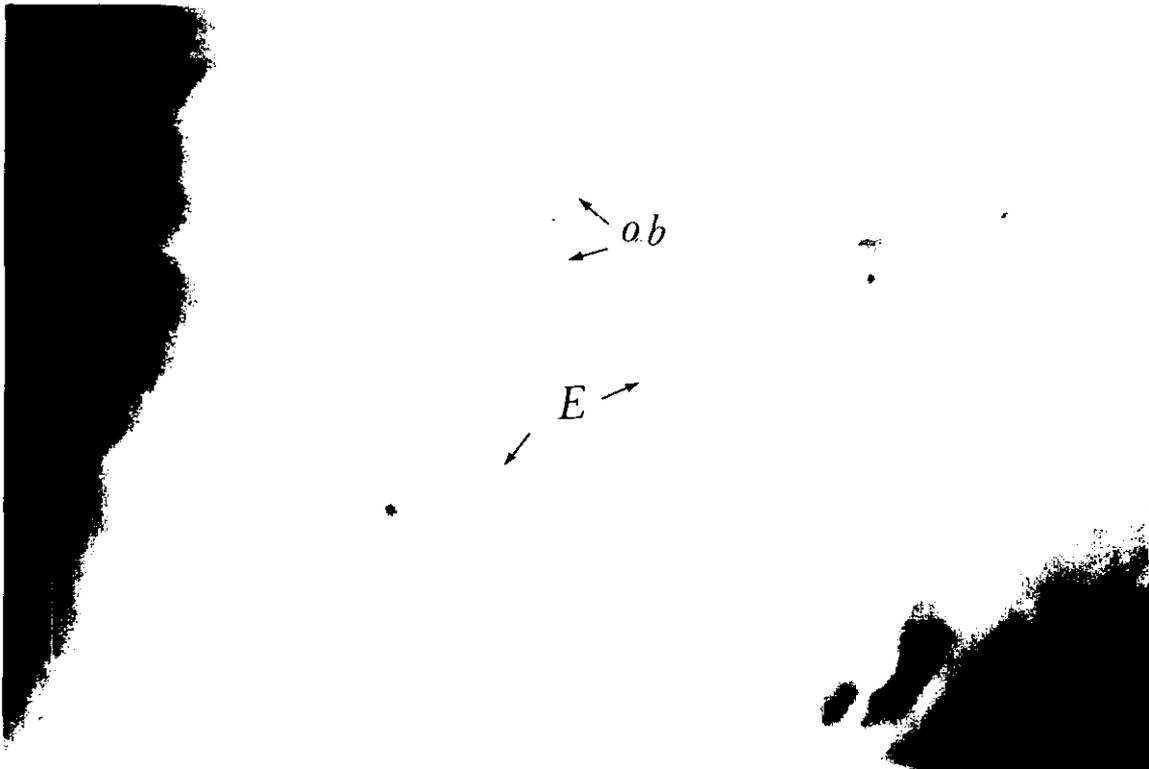


Figura 22. Ovario completo de una hembra tratada con 12.5 mg/kg de DES, donde se observan una gran cantidad de ovocitos pequeños y blanquecino (ob), así como embriones (E) y ovocitos en desarrollo.

## II) PROPORCIÓN SEXUAL .

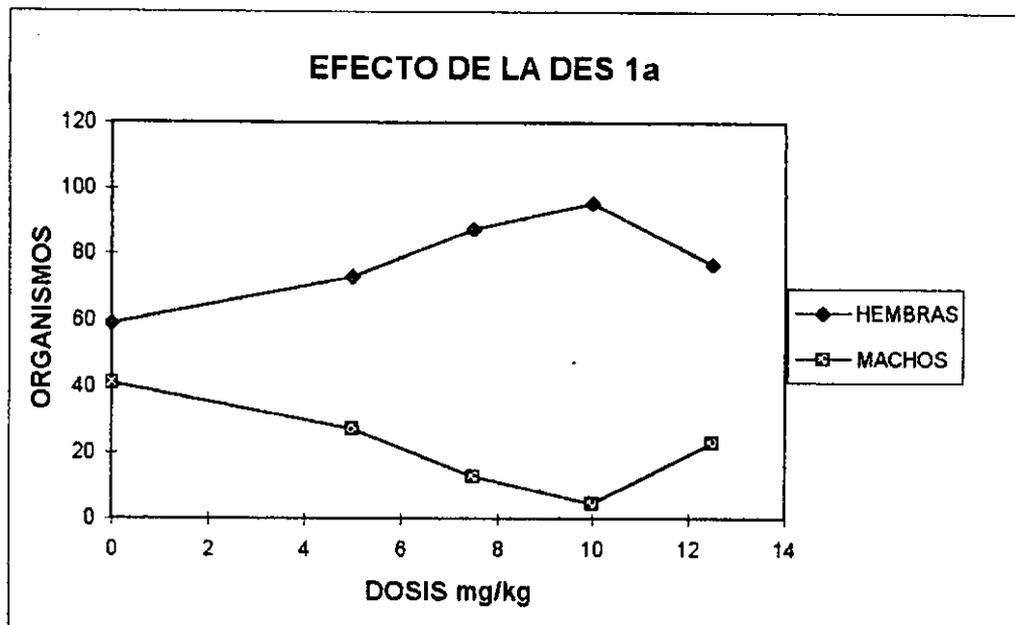
En los experimentos con DES se aprecia el incremento en el número de embriones femeninos, al aumentar la concentración de la hormona, se obtuvo la generación F1 con un total de 1172 organismos los cuales fueron separados de sus madres, la relación en la proporción sexual hembra macho se obtuvo al momento de manifestar los caracteres sexuales secundarios los cuales se cuantifican y presentan en porcentajes (tabla 10).

Tabla. 10. Población total de peces de la F1, desarrollo de hembras y machos en los tres lotes.

DOSIS DES (mg/kg)	%HEMBRAS			%MACHOS		
	1a	2a	3a	1 <sup>a</sup>	2a	3a
.0	59	73.6	62	41	26.4	38
5	73	75	71.4	27	25	28.6
7.5	87.5	70	73.4	12.5	30	26.6
10	95.5	73	84.6	4.5	27	15.4
12.5	77	89	63.6	23	11	36.4

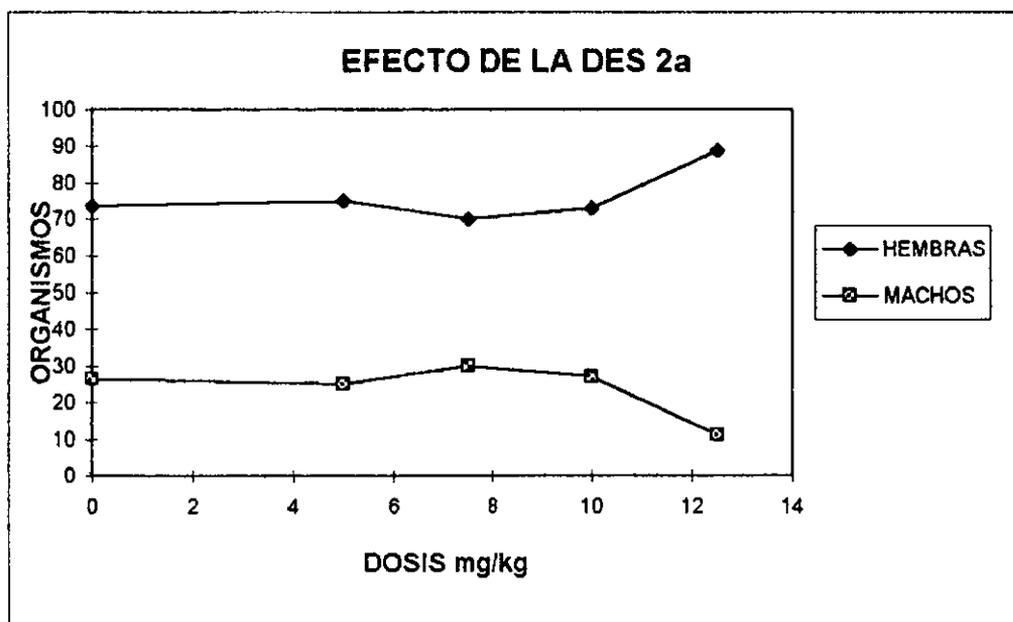
De cada uno de los tratamientos y de los lotes experimentales se muestran los resultados del efecto de la DES en la población de los peces de la F1 en las gráficas 22, 23 y 24.

En el primer lote se observa el efecto de la DES, incrementando la cantidad de hembras conforme aumenta la concentración de hormona, disminuyendo notablemente en la dosis más alta (12.5mg/kg).



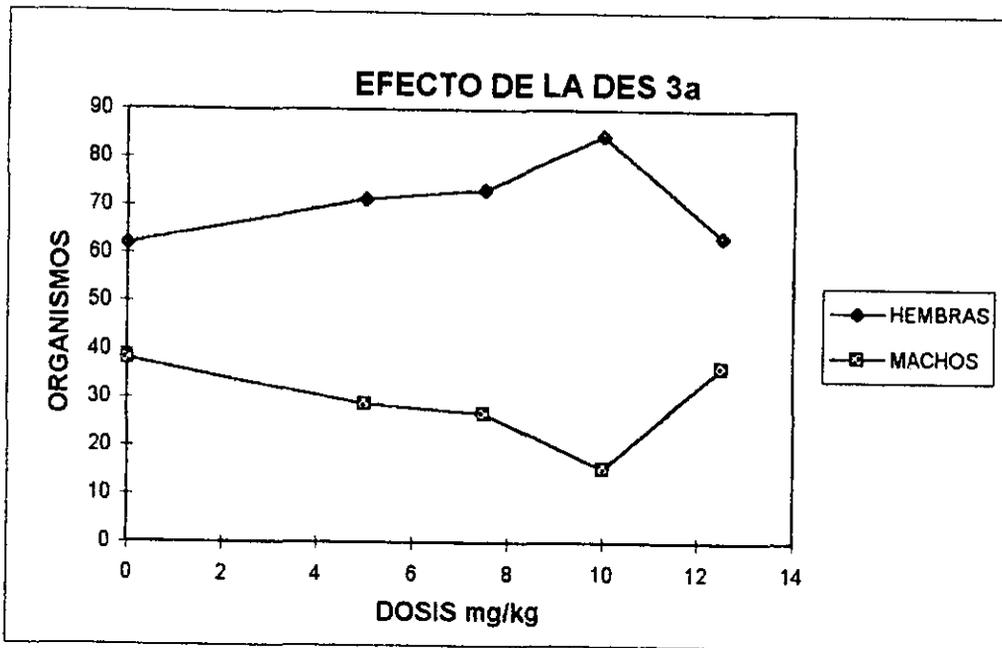
Gráfica 22. Relación obtenida del primer lote experimental de la F1.

En el segundo lote experimental no se manifestó ningún efecto notable de la presencia de hormona, el número de hembras fue muy semejante a los controles, se incrementa la inducción en la dosis más alta.



Gráfica 23 . Relación obtenida del segundo lote experimental de la F1.

En el tercer lote experimental el efecto de la hormona fue similar al obtenido en el lote 1, al incrementar la dosis se indujo una mayor cantidad de hembras, decreciendo su efecto en la de 12.5mg/kg.



Gráfica 24. Relación obtenida del tercer lote experimental de la F1.

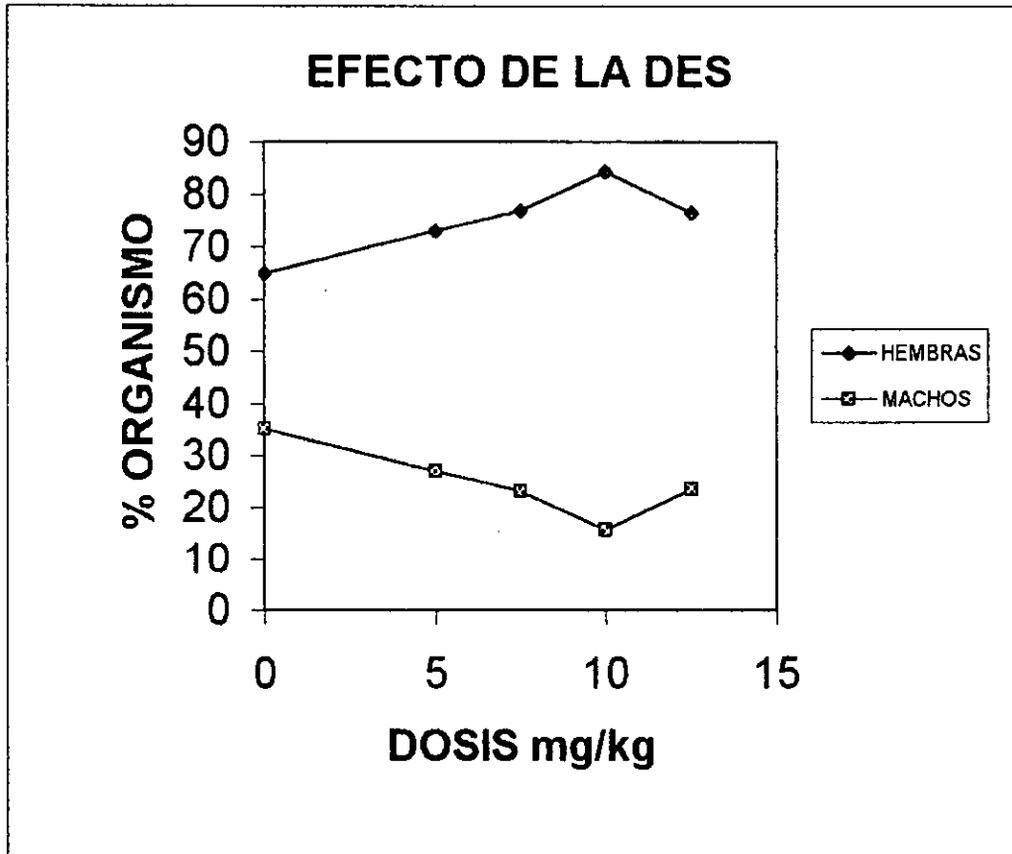
Con los resultados de los tres experimentos, se obtuvo el porcentaje de la población (tabla 11), en ninguno de los tratamientos se obtuvo el 100% de hembras.

Tabla.11. Porcentaje de inducción sexual, por tratamiento con DES.

DOSIS (mg/kg)	%HEMBRAS	%MACHOS
0	64.8	35.2
5	73.13	26.87
7.5	77	23
10	84.36	15.64
12.5	76.56	23.45

En la gráfica 25 se presenta el efecto de la Dietilestilbestrol en toda la población de embriones de la F1 cabe señalar que la población de hembras en los controles es mayor en todos los lotes.

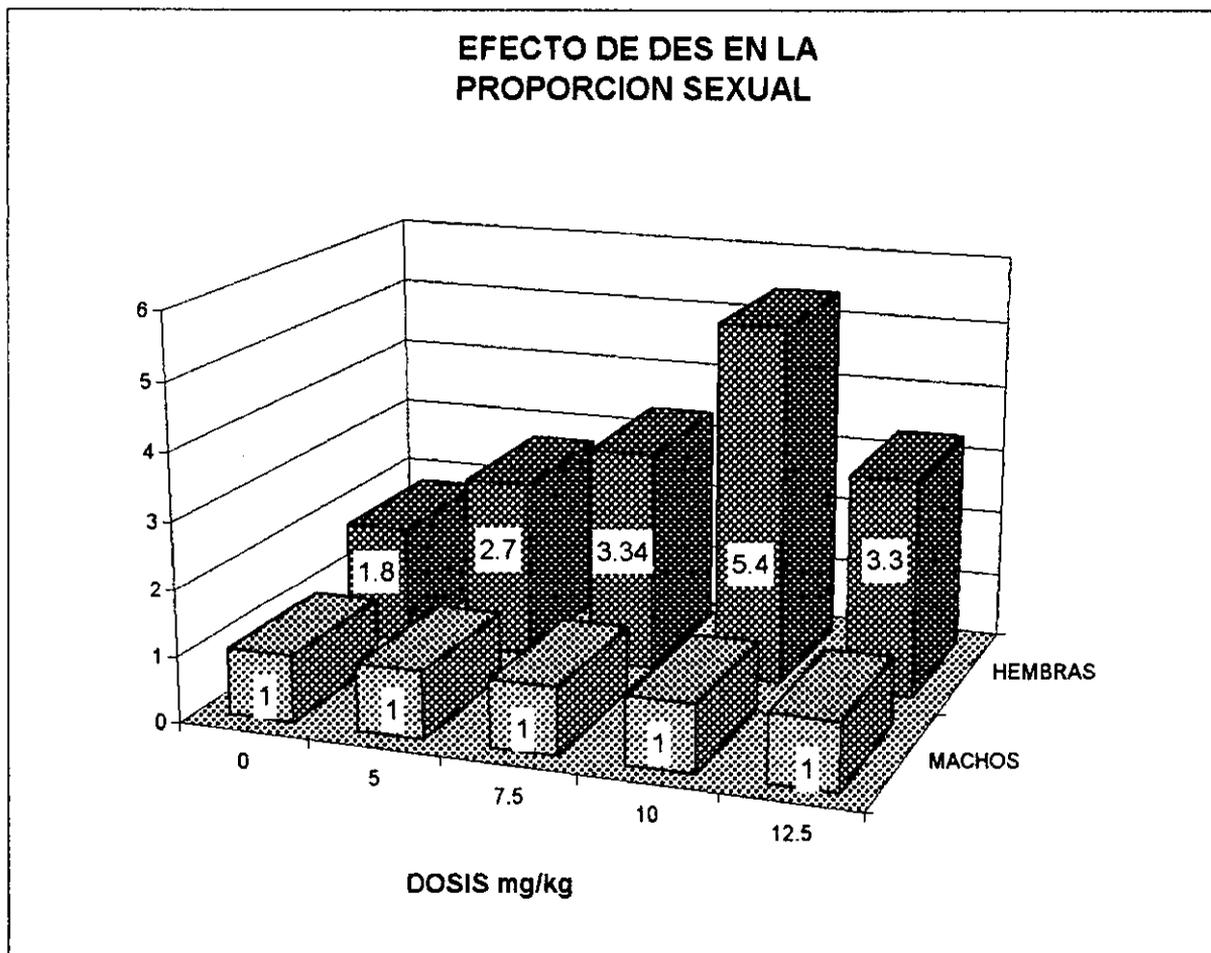
En los resultados se presenta un incremento en el número de hembras al aumentar la dosis, pero se observa una disminución del efecto en la más alta (12.5mg/kg), lo cual no concuerda con lo esperado esto lo podríamos explicar al analizar los resultados de las gónadas y su histología.



Gráfica 25. Relación en toda la generación de la F1.

Los resultados muestran claramente el efecto de esta hormona en la inducción de crías hembras, estableciendo una mayor proporción de hembras que de machos. Al aplicar la prueba estadística, todos los grupos tratados presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la proporción sexual con respecto a los controles, ver apéndice 1 y 2.

En poblaciones naturales la proporción sexual siempre es favorable a las hembras gráfica 26, esta constante se mantuvo en condiciones experimentales; al alimentar a las hembras con DES este estrogéno influye notablemente en la población de hembras de la F1 desde la dosis de 5mg/kg hasta la de 12.5mg/kg en estos experimentos es notable su efecto en la de 10.0mg/kg. Con las dosis utilizadas no se obtuvo el 100% de inducción de hembras en la población F1.



Gráfica 26. Proporción sexual de las crías de la generación F1.

## DISCUSIÓN

La elección de *Xiphophorus helleri* se realizó considerando varias características importantes: su marcado dimorfismo sexual, reproducción vivípara, fácil adaptación a condiciones de laboratorio, amplia distribución en México y se colectan fácilmente de poblaciones naturales. Estas características permiten que esta especie sea un modelo ideal para inducción y reversión sexual utilizando hormonas en hembras preñadas para determinar los efectos de inducción en el dimorfismo y proporción sexual. Es importante mencionar que en ninguno de los trabajos revisados hasta el momento con especies vivíparas u otras especies de los muchos trabajos en reversión sexual presentan estudios a nivel histológico de gónadas o de otros órganos, plantean baja fecundidad y que las hembras sufren efectos negativos durante y después del tratamiento pero no explican el por qué de estas alteraciones que se presentan en las hembras.

La  $17\alpha$ -metiltestosterona es un andrógeno, que ha sido utilizado para masculinización en peces y el dietilelbestrol es un estrógeno empleado en la feminización de peces, ambas son sintéticas muy estables químicamente y fácilmente absorbidas por tubo digestivo.

Para determinar las dosis a utilizar en *X. helleri* se realizó una investigación bibliográfica. En tilapia se ha reportado el 100% de reversión con dosis desde 20 a 300 mg/kg en la dieta, aplicadas durante 25 a 180 días, principalmente en crías de 10-12 mm, cuando comienza el desarrollo de la gónada (Basavaraja *et al.*, 1990). En el caso de *X. helleri*, durante el desarrollo embrionario se inicia la formación de las gónadas aproximadamente a una longitud de 2.8mm observándose completas a los 3.57mm.

Se probaron diferentes concentraciones de las dos hormonas, para ver que efecto tenían en estos organismos (6.5, 12.5, 18.5, y 25 mg/kg), en ambas las dosis de 18.5 y 25 mg/kg resultaban ser tóxicas, las hembras perdían peso y coloración, se observaban de color blanco (transparentes) con la base de las aletas de color amarillo y finalmente morían, sin dejar descendencia.

El efecto de la hormona  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) con respecto a la proporción sexual de los peces de la F1, influyó en un aumento en la inducción de machos a partir de las dosis 7.5, 10.0 y 12.5 mg/kg como se aprecia en las gráficas. Si analizamos los resultados de las pruebas estadísticas encontramos que estas diferencias son significativas ( $P < 0.05$ ) Apéndice 1 y 2.

A través del análisis estadístico se demuestra que no existen diferencias entre cada una de las dosis, no tiene caso aplicar tantas dosis, en caso de querer

obtener una buena cantidad de machos o de hembras, se recomienda la dosis en donde la proporción sexual hembra:macho fue de 1:5 (10mg/kg) para la MT y de 5.4:1 (10mg/kg) para DES.

El efecto del dietilelbestrol (DES) en la inducción de hembras de la F1 teniendo como referencia la proporción sexual hembra:macho de los controles 1.7:1 fue positivo desde la dosis de 5.0mg/kg hasta la de 12.5 mg/kg obteniéndose los mejores resultados con la dosis de 10.0mg/kg. Estadísticamente todos los tratamientos presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a los controles. Esta hormona aparentemente no altera la morfología y crecimiento de las hembras.

En los lotes trabajados para el presente estudio no se alcanzó el 100% de inducción no obstante, en trabajos posteriores se siguieron las mismas dosis con crías de 10 días de nacidas alimentados con MT durante 60 días, obteniéndose el 100% de masculinización en dosis de 7.5, 10 y 12.5 mg/kg con una mortandad nula durante todo el tratamiento (Márquez y Fuentes en preparación). Lim *et al.*, (1992) alimentó a crías de 2mm de *X. helleri* con MT obtuvieron el 100% de masculinización con dosis altas de 500 y 750 mg/kg, reporta que estas dosis deprimen el crecimiento. Nava-Bautista *et al.*, (1997) trató crías de 28 días de nacidas con MT a una dosis de 35mg/kg administrada durante 78 a 170 días reportando masculinización del 96.8% y 100%.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir que el tiempo de la diferenciación sexual de la gónada es incompleta durante el desarrollo embrionario y es probable que continúe después del nacimiento.

Takahashi (1975) planteo que en especies vivíparas es mejor la aplicación de hormonas durante el tiempo de gestación, ya que la formación de la gónada se realiza durante el desarrollo embrionario. En el presente estudio no encontramos el tiempo labil en la diferenciación sexual de la gónada o fue incompleto el tratamiento, por lo que planteamos que sería conveniente continuar alimentando a las crías después del nacimiento, para encontrar los tiempos de diferenciación de la gónada y acortar los tiempos de tratamiento.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son opuestos a lo reportado por Kavupurat y Padian (1993) quienes reportan que las especies vivíparas de la familia Poeciliidae requieren de altas dosis de hormona durante la etapa de gestación 300-400mg/kg en la obtención de poblaciones monosexo incrementándose la mortandad de las hembras.

En este trabajo se demuestra que las dosis altas son tóxicas lo que explica las posibles causas de la mortandad de los peces, siendo éste el primer diseño experimental que aplica las dosis más bajas con muy buenos resultados. Los resultados obtenidos permiten sugerir su utilidad a nivel productivo ya que los tiempos de aplicación son cortos y las dosis son bajas minimizando el costo y reduciendo sus efectos negativos.

El empleo de las dos hormonas no afectó el crecimiento y peso de las hembras, la aplicación de MT incrementó su colorido y vistosidad, las hembras alimentadas con DES no presentaron diferencias en su morfología, con la dosis más alta se observa una pequeña disminución en el peso al final del tratamiento, esto se debe principalmente a las alteraciones que se presentan en la gónada se probó que si se utilizan dosis más altas estas resultan ser tóxicas, incluso causando la muerte a las hembras y con las dosis 12.5mg/kg se ve afectado el número de crías al nacimiento,

Los periodos de gestación de las hembras tratadas aparentemente es normal su desarrollo considerando que al nacimiento tienen un comportamiento como las crías de los controles en cuanto a tamaño, peso, alimentación, su crecimiento y desarrollo en la etapa juvenil es semejante a todos los peces así como en la manifestación de los caracteres sexuales secundarios y en los tiempos en que se inicia la diferenciación y el comportamiento de adultos. El tiempo de gestación en el laboratorio fue de 37 a 50 días, el menor rango observado con DES (12.5 mg/kg), probablemente esté aumentando el metabolismo de los embriones y acelere su desarrollo.

El comportamiento de los organismos como lo menciona Beaugrand (1984), se presenta con jerarquías tanto para machos como para hembras, notándose en los acuarios siempre una hembra y un macho dominante, si se mantienen un mayor número (12-24) de organismos, estos saltan fuera y mueren por lo que los contenedores tienen que mantenerse tapados.

Tomando en cuenta que un macho puede fecundar a varias hembras, se colocaron dos machos por una hembra para asegurar que el proceso de fecundación se llevara a cabo durante las 48 horas en que fueron mantenidos juntos, con los tratamientos efectuados el comportamiento de esta especie no se ve afectado. Con respecto a las crías no hubo mortandad durante todo el tratamiento.

Se presentaron los resultados de la dosis más alta (12.5mg/kg) en estas los daños son más severos, comparándolos con los controles, los cortes histológicos de las gónadas de la dosis de 5. 7.5 y 10 mg/kg, las alteraciones no son tan notorias, el número de ovocitos degenerados no es tan numeroso.

Al realizar el análisis histológico, se observan múltiples alteraciones, en algunos campos se presentan gran cantidad de ovocitos atrésicos, degeneración y muerte de ovogonias, se incrementan las células que están presentes en los procesos de fagocitosis, aumentando la vacuolización, anormalidades en el número y desprendimiento de las capas celulares. En algunos campos da la impresión que la gónada se encuentra en un proceso infeccioso por lo que planteamos un efecto tóxico por parte del tratamiento realizado y aún así se observan los embriones sanos y su crecimiento es el normal.

En el caso de las hembras aparentemente no hay alteraciones en su crecimiento, ni en su comportamiento. Con respecto a la dosis es importante mencionar que en la dosis de 5mg/kg el aspecto de la gónada es muy semejante a la de los controles tanto morfológica como histológica, no se encontraron diferencias ni alteraciones en la configuración y organización de los ovocitos; a medida que se aumenta la concentración de hormona (7.5, 10, 12.5mg/kg) se incrementan la presencia de alteraciones en los tejidos de la gónada. Las alteraciones más evidentes y notorias se presentaron en la de 12.5mg/kg, de estos resultados podemos sugerir que la dosis más baja no está afectando a las hembras y también se puede apreciar que para MT la diferenciación sexual con esta dosis no es significativa pero si está induciendo a machos; para DES si es significativa en la diferenciación de hembras; con la dosis de 10 mg/kg observamos que también se presentan alteraciones pero no son tan evidentes como en las hembras alimentadas con 12.5mg/kg.

Es importante tomar en cuenta los efectos de las hormonas ya que se han planteado ventajas: como la de acelerar el desarrollo, mejorar la calidad de la carne en especies comestibles, la obtención de poblaciones monosexo y estériles, y desventajas: como pueden ser los efectos tóxicos afectando la supervivencia, retrasan los procesos de maduración sexual afectando la ovogénesis y la espermatogénesis (Padian *et al.*, 1995).

Con respecto al acuarismo en este trabajo se demuestra que con  $17\alpha$ -metiltestosterona se obtienen características atractivas para la comercialización como es el incremento en la intensidad de los colores y el desarrollo de las aletas que los hace ver más vistosos y atractivos para la venta. La utilización de la dietilestilbestrol en la obtención de hembras y así incrementar el potencial reproductivo.

Este estudio representa el primer reporte en relación a la utilización de alimento mezclado con el esteroide en la dieta de hembras preñadas de *X. helleri*, es el método más frecuente para la mayoría de las especies en las que se ha investigado el proceso de inversión sexual, es sencillo y fácil de trabajar.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## CONCLUSIONES

- ◆ La dosis de 10 mg/kg de  $17\alpha$ -metiltestosterona y de dietilestilbestrol es la indicada para lograr inducción sexual en *Xiphophorus helleri*.
- ◆ El efecto de la MT en las hembras en tratamiento es notable ya que altera su morfología, este andrógeno induce la manifestación de los caracteres sexuales secundarios de machos en las hembras preñadas; en la gónada se presentan modificaciones en el desarrollo normal de los ovocitos, afectando la ovogénesis, y alterando el número de ovocitos en desarrollo lo cual se manifiesta en la cantidad de crías al nacimiento, siendo tóxica en la gónada, recomendamos la dosis de 10 mg/kg para la inducción de machos.
- ◆ Para comercializar peces de ornato con caracteres sexuales secundarios de machos la administración de MT es la más indicada ya que esta hormona incrementa la coloración y la vistosidad de los peces.
- ◆ La MT y la DES en las crías, no produjo alteraciones en su desarrollo y comportamiento, en la manifestación de caracteres sexuales secundarios estos se manifestaron normalmente a la edad y al mismo tiempo que las crías de las hembras control, no se observaron alteraciones de desarrollo.
- ◆ El efecto de la DES en las hembras, no modifica su morfología tienen la misma apariencia que las hembras control, lo que se observa en la histología de la gónada son alteraciones graves en el desarrollo de los ovocitos, que afectan seriamente la ovogénesis normal.
- ◆ Para determinar el grado de alteraciones del organismo por la presencia de hormona, sería recomendable realizar una investigación más amplia a nivel histológico de otros órganos como, hígado, cerebro e hipófisis.

# BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, J.**, 1970, Peces mexicanos (claves), Inst. Nac. Inv. Pesqueras, S.I.C.
- Anderson, C. E. and 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 Fishes, Am. Fish. Soc., Auburn, Ala.
- Ariel I. M.**, 1980, Theories regarding the cause malignant melanoma, Surg. Gynecol Obstet., 150(6):907-917.
- 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.
- Bardach, E. J., Ryther, H. J. y McLaren O. W.**, 1986, Acuacultura, crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce, AGT Editor, S. A. México.
- Baroiller, J.-F., Guiguen, Y. And Fostier, A.**, 1999, Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cell. Mol. Life Sci. Vol. 55: 900-931.
- Bao I.Y. and Kallman K.D.**, 1978, The genetic and endocrine control of sexual maturation in hibrids between *Xiphophorus helleri* and *Xiphophorus maculatus*, Am. Zool., 18(3):669.
- Bao I.Y., Kallman K.D.**, 1982, Genetic control of the hypothalamo pituitary axis and the effect of hybridization of sexual maturation *Xiphophorus* pisces Poeciliidae, J. Exp. Zool., 220(3):297-310.
- Bao, Isaac Y.**, 1981 The genetic and endocrine control of sexual maturation and sterility in hibrids between *Xiphophorus helleri* and *X. maculatus*., D. Abstracts International, 42(2-B):465.
- Basavaraja N., Nandeesh M., Varghese T., Kesavanath P. and Srikanth G.**, 1990, Induction of reversal in *Oreochromis mossambicus* by diethylstilbestrol, J. Appl. Ichthyol., 6:46-50
- Beaugrand J.P., Caron J. and Comeau L.**, 1984, Social organization of small heterosexual groups of green swordtails *Xiphophorus helleri* Pisces Poeciliidae under conditions of captivity, Behaviour, 91(1-3):24-60.
- Billard, R.**, 1983, Sterilization, sex inversion and identification of sex in fish reared in fish farm, Rev. Ital. Piscic. Ittiphys. A., 18:45-58.
- Buddle, C.R.**, 1984. Androgen-induced sex-inversion of *Oreochromis* (trewavas) hibrid frystocked into cages standing in an earthen pond. Acuaculture. 40:233-239.
- Carrillo, M.**, 1977, Histología de la glandula pituitaria de la chucla (*Spicera chryselis* C.V.), Inv. Pesq., 4 (2): 385-440.
- Castrucci A.M., Visconti M.A., Hadley M., Hruby V., Oshima N. and Fujii R.**, 1988, Melanin concentrating hormone MCH control of chromatophores, Progress in clinical and biological research, 256:547-558, Sao Paulo.
- Cribb, T.H.**, 1988, Life cycle and biology of prototransversotrema-steeri angel 1969 digenea transversotrematidae, Aust. J. Zool., 36(2):111-130.
- Cohen, H.**, 1946, Effects of sex hormones en the development of the platyfish, Zoológica, 31:121-128.
- Donaldson, E.M., Fangerrlund, U.H.M., Higgs, D.A. and McBride, J.R.**, 1978, Hormonal en hancement of growth. In: W.S. Hoar, D.J., Randall and J.R. Brett (Editores), Fish Physiology Vol. VIII. Academic Press, New York, NY, pp, 456-597.
- Essenberg, J. M.**, 1923, Sex-Differentiation in the viviparous teleost *Xiphophorus helleri* Heckel., Biol. Bull., Vol. 45 : 46-97.
- Fagerlund, U.H.M. and McBride, J.R.**, 1975, Grow increment and some characteristics of juvenile coho salmon receiving diets supplemented with 17a-methyltestosterona, J. Fish Biol., 7: 305-314.

- Franck D., Hannes R-P., Lanffermann H. and Ribowski A., 1985, Effects of social isolation on aggressiveness in fish with special reference to the swordtail *Xiphophorus-helleri*. Behav. Processes, 10(4):415-428.**
- Grannam, A.L., and Lovell, R.T., (1991), Effects of feeding 17 $\alpha$ - methyltestosterona, 11-Ketotestosterone, 17 $\beta$ -estradiol, and 3,5,3-triiodothyronine to channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Acuaculture, 92:377-388., Amsterdam.**
- Guerrero III, R.D., 1975. Use of androgen for the production of all malle *Tilapia aurea* (Steindachner). Trans. Am. Fish. Soc., 104:324-348.**
- Haider S.G. and Blum V., 1977, On the Evolution of the pituitary gonadotropin system in lower vertebrates, Invest. Pesq., 41(1):185-204.**
- Hannes R-P., 1985, The influence of standars-opponent tests on blood androgen and corticoid leveles of high-ranking and low-ranking swordtail males before and after social isolation, Aggressive Behav., 11(1):9-16.**
- Hannes R-P. and Franck D., 1983, Effect of social isolation on androgen and cortico steroid leveles in a cichlid fish *Haplochromis-burtoni* and swordtails *Xiphophorus-helleri*, Horm. Behav., 17(3):292-301.**
- Harper, H.A., 1980, Manual de química fisiológica, Edit. El Manual Moderno S.A. México.**
- Hernandez, B.S., 1988. Inversión sexual de la mojarra *Cichlasoma urophthalmus* a través de la administración de la 17 $\alpha$  -metilttestosterona en el alimento. Tesis de Maestría, CINVESTAV Merida, IPN.**
- Hunter,G.A. and Donaldson, E.M.,1983. Hormonal sex control and its aplication fish culture, In: The fish physiology Vol IX B (Hoar, W.S., Randall, J.D., Editors). Academic New York..**
- Hurk vanden R., 1974, Steroidogenesis in the testis and gonadotropic activity in the pituitary during postnatal development of the black molly (*Molliensia latipinna*). Proc. Koninkl Nederl Akad Wetensch Ser. C. 77 : 193-200.**
- Hopkins, K.D., Shelton, W.L. and Engle, C.R., 1979. Estrogen sex-reversal of *Tilapia aurea*. Acuaculture, 18:263-268.**
- Kallman, K.D., 1975, The platyfish, *Xiphophorus maculatus*, Hambook of Genetics, Vol. 4; 81-132, N.Y.**
- Kavumpurath, S., and Padian, T.J., 1993, Masculinization of *Poecilia reticulata* by administration of synthetic or natural androgen to gravid females, Aquaculture, 116:83-88.**
- Kramer, C.R. and Kallman, K.D., 1985, Sex differentiation of somatic tissue in the unsexualise gonad primordia of the embryos of three species of Poeciliid fish, J. Anat., 140:269-277.**
- Liley, N. R., 1969, Hormones and reproductive behevoir in fishes. In: The fish physiology Vol III (Hoar, W.S., Randall, J.D., Editors). Academic New York.**
- Lim, B.H.,Phang, V.P.E. and Reddy, P.K., 1992, The effects of short-term treatment of 17 $\alpha$ -methyltestosterona and 17 $\beta$ -estradiol on growth and sex ratio in the red variety of swordtail, *Xiphophorus helleri*, . J. Aqua. Trop., 7:267-274.**
- Lodi, E., Instances of inversion in the domesticated swordtail *Xiphophorus helleri* Heckel (Pisces, Osteichthyes), Experientia 35, Italy.**
- Lynch, M., Stanley, R., Mellor, Spare, P., 1982, Métodos de laboratorio, 2ª Edición, Ed. Interamericana, México.**
- McKerns, K. W.,1969, Steroid hormones and metabolism, Appleton-Century-Crofts, Meredith Corporation, New York, N.Y.**
- McLean, E. and Donaldson, E.M., 1990, Absorption of bioactive proteins by the gastrointestinal tract of fish: a review. J. Aquat. Anim. Health, 2: 1-11.**

- McGeachin, R.B., Robinson, E.H. and Nell, W.H., 1987, Effect of feeding high levels of androgens on the sex ratio of *Oreochromis aureus*, *Acuaculture*, 61:317-321.**
- Milton D. A., Arthington A. H., 1983, Reproductive biology of *Gambusia affinis holbrooki* baird and girard *Xiphophorus helleri*(Gunter) and *Xiphophorus maculatus* (Heckel) (pisces; Poeciliidae) in Queensland, Australia, *J. Fish Biology*, 23(1):23-41.**
- Nava-Bautista, J. M. and Rodriguez-Gutiérrez, M., 1997, Effect of 17 $\alpha$ - methyltestosterona and vitamin B complex on the sexual reversion induction of two of the development stages of *Xiphophorus helleri*, Heckel, 1848 (Pisces: Poeciliidae). *J. Aqua. Trps*, 12(1): 65-71.**
- Neumann, F., von Berswordt-Wallrabe, R., Elger, W., Steinbeck, H., Hahn, J. D., and Kramer, M., 1970, Aspects of androgen-dependent events as studied by antiandrogens. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 26: 337-405.**
- O Mallery B. W., and Strott, C. A. 1993, Hormonas esteroides ó metabolismo y mecanismo de acción en Endocrinología de la Reproducción, Yen , S.M. y Jaffe, R. Edit. Panamericana, Argentina.**
- Padian T.J., and S.G., Sheela, 1995. Hormonal induction of reversal in fish, *Acuaculture*, 138 : 1-22.**
- Schreibman M. P., Berkowitz E.J. and Hurk R., 1982, Histology and histochemistry of the testis and ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity, *Cell Tissue Res*, 224: 81-87.**
- Schreibman M. P., Kallman K.D., 1977, The genetic control of the pituitary-gonadal axis in the platyfish *Xiphophorus maculatus*, *J Exp. Zool.* 200:277-294.**
- Siciliano M. J. and Perlmutter A., 1972, Maternal effects on development of melanoma in hybrid fish of the genus *Xiphophorus*, *J. Natl. Cancer Inst.* 49(2):415-421.**
- Solar, I.I., Donaldson, E.M. and Hunter, G.A., 1984, Optization of treatment regiment for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rhichardson) by oral administration of 17 $\alpha$ -methyltestosterona, *Acuaculture*, 42:129-139.**
- Sower, S.A. and Iwamoto, R.N., 1985, The identification of the sex steroid, testosterona in various commercial salmon diet, *Acuaculture*, 49:11-17.**
- Takahashi, H., 1975, Functional feminization of genetic males of the guppy *P. reticulata* estrogenafter birth, *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.***
- Tavolga, W. N., 1949, Embryonic development of the platyfish (*Platypoecilus*), the swordtail (*Xiphophorus*), and their Hybrids, *Bull. of The American Mus. of Nat. Hist.*, Vol. 94:4 in 1950.**
- Veldhuis, J, 1993, Eje- hipotalámico- hipofisiario- testicular, en Endocrinología de la Reproducción, Yen, S.M . y Jaffe, R. Edit. Panamericana, Argentina.**
- Wallace, A. R. and Sellman K., 1981, Cellular and dynamic aspect of oocyte growth in teleost, *Amer. Zool.*, 21: 325-343.**
- Yamasaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. *Acuaculture*. 33:329-354.**
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: "The fish physiology" Vol. III (Hoar, W.S., Randall, J.D., Editores). Academic Press. 477 p.**
- Zanders C.D. and Dzwillo M., 1969, Investigations on the development and heredity of the caudal fin of the *Xiphophorus* species pisces, *Z. Wiss. Zool.*, 178(3-4):276-315.**
- Zanuy, S. y M. Carrillo, 1987, La reproducción en los teleósteos y su aplicación en acuicultura, En reproducción en acuicultura, CAICYT, España.**
- Zimmerer, E.J., 1987. Genetic basis for alternative reproductive tactics in the pygmuy swordtail, *Xiphophorus nigrensis*. *Evolution*. 43:1298-1307.**

APENDICE 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO "STATISTICA 3.11" PARA WINDOWS.

Efecto de la hormona MT en el desarrollo de machos de la F1.

Tukey HSD test; variable VAR3 (new.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

INTERACTION: 1 x 2

		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
		38.90000	70.53333	82.53333	83.43333	74.63333	61.10000	29.46667	17.29000	16.56667	25.36667
1	1 {1}		.127990	.012150	.010085	.059740	.519846	.994175	.554388	.512113	.940328
1	2 {2}	.127990		.970742	.954716	.999993	.994175	.020615	.001704	.001480	.008840
1	3 {3}	.012150	.970742		1.000000	.998457	.564814	.001764	.000286	.000270	.000823
1	4 {4}	.010085	.954716	1.000000		.996491	.512113	.001480	.000267	.000254	.000704
1	5 {5}	.059740	.999993	.998457	.996491		.940328	.008840	.000799	.000704	.003790
2	1 {6}	.519846	.994175	.564814	.512113	.940328		.127990	.011714	.010085	.059740
2	2 {7}	.994175	.020615	.001764	.001480	.008840	.127990		.967976	.954716	.999993
2	3 {8}	.554388	.001704	.000286	.000267	.000799	.011714	.967976		1.000000	.998157
2	4 {9}	.512113	.001480	.000270	.000254	.000704	.010085	.954716	1.000000		.996491
2	5 {10}	.940328	.008840	.000823	.000704	.003790	.059740	.999993	.998157	.996491	

los p<0.05 poseen diferencias significativas

Tukey HSD test; variable VAR3 (new.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VARI

		{1}	{2}
		70.00667	29.95800
1	.... {1}		.000151
2	.... {2}		.000151

los p<0.05 poseen diferencias significativas

- 1 machos
- 2 hembras
- 1 controles (0.0)
- 2 dosis (5.0)
- 3 (7.5)
- 4 (10.0)
- 5 (12.5)

Efecto de la hormona MT con respecto a la longitud y el peso de las hembras.

Tukey HSD test; variable NEWVAR4 (datlong.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VARI

		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
		14.00000	18.00000	19.25000	23.75000	34.75000
10	{1}		.700798	.466351	.045001	.000193
20	{2}	.700798		.993887	.380837	.000722
30	{3}	.466351	.993887		.606361	.001376
40	{4}	.045001	.380837	.606361		.020960
45	{5}	.000193	.000722	.001376	.020960	

los  $p < 0.05$  poseen diferencias significativas

## Efecto de la hormona DES en el desarrollo de las hembras de la F1

Tukey HSD test; variable VAR3 (des.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

INTERACTION: 1 x 2

		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
		35.13334	26.86667	23.03333	15.63333	23.46667	64.86667	73.13333	76.96667	84.36667	76.53333
1	1 {1}		.981056	.840245	.299164	.865303	.024044	.002396	.000890	.000256	.000987
1	2 {2}	.981056		.999947	.888080	.999981	.002396	.000365	.000239	.000190	.000247
1	3 {3}	.840245	.999947		.991001	1.000000	.000890	.000239	.000200	.000187	.000203
1	4 {4}	.299164	.888080	.991001		.986729	.000256	.000190	.000187	.000179	.000187
1	5 {5}	.865303	.999981	1.000000	.986729		.000987	.000247	.000203	.000187	.000206
2	1 {6}	.024044	.002396	.000890	.000256	.000987		.981056	.840245	.299164	.865303
2	2 {7}	.002396	.000365	.000239	.000190	.000247	.981056		.999947	.888080	.999981
2	3 {8}	.000890	.000239	.000200	.000187	.000203	.840245	.999947		.991001	1.000000
2	4 {9}	.000256	.000190	.000187	.000179	.000187	.299164	.888080	.991001		.986729
2	5 {10}	.000987	.000247	.000203	.000187	.000206	.865303	.999981	1.000000	.986729	

los  $p < 0.05$  poseen diferencias significativas

Summary of all Effects; design: (des.sta)

1-VAR1, 2-VAR2

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	1	19010.90	20	87.37334	217.5824	.000000
2	4	.00	20	87.37334	.0000	1.000000
12	4	299.96	20	87.37334	3.4331	.027223

1 Hembras  
2 Machos  
1 al 5 las dosis

## APENDICE 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO "SIGMA STAT 2.0" PARA WINDOWS.

### Efecto de la hormona MT en el desarrollo de Machos de la F1.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: Col 1

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
10.000 vs. 0.000	44.533	5	6.090	Yes
10.000 vs. 5.000	12.900	5	1.764	No
10.000 vs. 12.500	8.800	5	1.203	No
10.000 vs. 7.500	0.900	5	0.123	No
7.500 vs. 0.000	43.633	5	5.967	Yes
7.500 vs. 5.000	12.000	5	1.641	No
7.500 vs. 12.500	7.900	5	1.080	No
12.500 vs. 0.000	35.733	5	4.887	Yes
12.500 vs. 5.000	4.100	5	0.561	No
5.000 vs. 0.000	31.633	5	4.326	No

Efecto de la hormona MT con respecto a la longitud y peso de las hembras preñadas.

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	Q	P<0.05
Col 2 vs Col 1	73.829 5	7.355	Yes	
Col 3 vs Col 1	38.043 4	3.790	Yes	
Col 5 vs Col 1	36.150 3	3.071	Yes	
Col 4 vs Col 1	8.575 2	0.729	No	

Efecto de la hormona DES en el desarrollo de hembras de la F1.

Comparison	Diff of Ranks	p	q'	P<0.05
Col 2 vs Col 1	433.500 3	6.026	Yes	
Col 3 vs Col 1	192.000 2	3.982	Yes	

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q	P<0.05
Col 2 vs Col 1	28.000 3	7.230	Yes	
Col 2 vs Col 3	17.000 2	6.208	Yes	
Col 3 vs Col 1	11.000 2	4.017	Yes	

Efecto de la hormona DES con respecto al peso y la longitud de las hembras preñadas.

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	Q	P<0.05
Col 2 vs Col 1	41.115 5	4.492	Yes	
Col 5 vs Col 1	35.310 4	3.858	Yes	
Col 3 vs Col 1	26.965 3	2.946	Yes	
Col 4 vs Col 1	11.610 2	1.269	No	