



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

00381

7

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INDUCCIÓN HORMONAL DEL SEXO EN  
*Poecilia sphenops*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**(BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

M. en C. BENJAMÍN BARÓN SEVILLA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Fernando Bückle Ramirez



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Dedico este trabajo, que sólo es una pequeña fracción de la comprensión y el amor que me han dedicado,

a mi esposa

**Diana Esmeralda Rodríguez Cortés**

y a mis hijos

**María Fernanda Barón Rodríguez**

y

**Benjamín Barón Rodríguez**

Deseo expresar mi gratitud a la

**Universidad Nacional Autónoma de México**

y a la

**Facultad de Ciencias**

por la oportunidad que me brindaron para realizar los estudios de Doctorado,

al

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

por los recursos financieros que me han permitido culminar esta etapa de mi  
formación,

al

**Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de  
Ensenada**

porque en su seno he realizado este anhelo de superación académica

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial

**Dr. Luis Fernando Bückle Ramirez**

**Dra. Sonia Sofía Espina Aguilera**

**Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés**

por sus enseñanzas

y a los miembros del jurado examinador

**Dra. María del Carmen Uribe Aranzabal**

**Dr. Edmundo Díaz Pardo**

**Dr. José Luis Arredondo Figueroa**

**Dr. S. S. S. Sarma**

por sus atinadas observaciones que contribuyeron  
a mejorar esta Tesis

Agradezco especialmente a mi Padre

**Alejandro Barón Rivera**

por todo,

y al

**Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez**

por su amistad y apoyo permanente.

Gracias también

Al C.I.C.E.S.E. en la persona del Director General **Dr. Francisco Javier Mendieta Jiménez** por el apoyo económico para la culminación de este trabajo.

Al **Dr. Jorge Cáceres Martínez** y en particular a la **Bíol. Yanet Guerrero Rentería** por su apoyo en el procesamiento histológico de las gónadas.

A la **Dra. Mónica Hernández Rodríguez** por su amistad y por su valiosa ayuda durante el desarrollo de esta investigación.

A la **M. en C. Olivia M. Tapia Vázquez** por sus valiosas recomendaciones para la extracción de las gónadas y los procedimientos histológicos utilizados en este estudio.

Al **Técnicos Francisco Valenzuela Buriel** por su valiosa ayuda en la edición de los esquemas de esta Tesis y al **Técnico Adrián Celaya Ortega** por su asistencia durante los experimento.

A **Benjamín Barón Rodríguez** por su ayuda en la edición de esta tesis.

A todos los compañeros y amigos del Departamento de Acuicultura que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

Benjamín Barón Sevilla

Esta Tesis se realizó bajo la Dirección del **Dr. Luis Fernando Bückle Ramirez** del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, (C.I.C.E.S.E.) y la Co-Dirección de la **Dra. Sonia Sofía Espina Aguilera** del Laboratorio de Ecofisiología, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, Ú.N.A.M.

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, (C.I.C.E.S.E.).

## CONTENIDO

i.	Resumen	1
ii.	Abstract	3
iii.	Introducción	5
iv.	Materiales y Métodos	12
v.	Resultados	25
v.1	Efecto de la temperatura y el pH sobre la proporción sexual de <i>Poecilia sphenops</i>	25
v.2	Inducción del sexo de <i>Poecilia sphenops</i> con 17 $\alpha$ etinilestradiol y 17 $\alpha$ metiltestosterona	27
v.2.1	Efecto del 17 $\alpha$ etinilestradiol y la 17 $\alpha$ metiltestosterona en la estructura histológica de las gónadas de <i>P. sphenops</i>	35
v.2.2	Efectos secundarios del 17 $\alpha$ etinilestradiol y la 17 $\alpha$ metiltestosterona en la morfología externa de <i>P. sphenops</i>	52
vi.	Discusión	60
vii.	Conclusiones y recomendaciones para el control del sexo en <i>Poecilia sphenops</i>	74
viii.	Literatura Citada	78

## I. RESUMEN

La expresión del sexo tiene gran significado en la biología de una especie porque existen importantes diferencias en las tasas de crecimiento, patrones de comportamiento, momento de ocurrencia de la reproducción, coloración, forma y tamaño entre los sexos. La naturaleza lábil de la determinación del sexo de los peces junto con el conocimiento de los procesos reproductivos ha propiciado el desarrollo de técnicas de inducción sexual, que son esenciales para impulsar el desarrollo de sistemas de producción piscícola.

En este estudio se investigó el efecto de los factores ambientales, temperatura y pH y de la administración oral de algunos esteroides sobre la proporción sexual del pez vivíparo *Poecilia sphenops*.

Para conocer el efecto de los factores ambientales sobre la proporción sexual de *P. sphenops*, 18 grupos cada uno con 4 hembras vírgenes y 2 machos sexualmente activos y sus respectivas progenies se cultivaron en diferentes combinaciones de temperatura (22, 26 y 30 °C) y pH (6.0, 7.0 y 8.0). Los resultados indican que el sexo de los peces depende de la interacción de estos factores ( $P < 0.001$ ). En todas las combinaciones el número de hembras superó a los machos y la menor proporción de machos se obtuvo en la combinación de 22 y 30 °C y pH 7; y de las hembras a 22 y 26 °C y pH 8. La única condición en la que la proporción sexual se aproximó a la unidad, fue en 22 °C - pH 8.0. A diferencia de los resultados publicados para otras especies de la familia Poeciliidae, se observó que una combinación de alta temperatura (30 °C) y pH 6 y 7 inducen las mayores proporciones de hembras.

Para inducir el sexo de los alevines recién nacidos, estos se alimentaron por cuarenta días con una dieta enriquecida con los esteroides sexuales 17  $\alpha$  etinilestradiol (EE) y 17  $\alpha$  metilt testosterona (MT); 0, 80, 120, 160, 200, 400 y 800 mg kg<sup>-1</sup>. La frecuencia de hembras y machos observada en los organismos tratados con EE fue diferente del control con una proporción de tres hembras y un macho ( $P < 0.001$ ). En la concentración más baja de EE (80 mg kg<sup>-1</sup>) la proporción de hembras se duplicó con respecto al control (6.6 ♀:1 ♂). Las frecuencias de hembras y machos tratados con las diferentes concentraciones de hormonas, no revelaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ); se observó un aumento gradual en la proporción de hembras (H/H+M) de 0.76 en el control a 1.0 cuando la concentración de EE fue de 400 mg kg<sup>-1</sup>. Cuando se suministraron 800 mg kg<sup>-1</sup> de EE se observó un 100% de mortalidad.

En referencia a la MT, la frecuencia de machos y hembras fue diferente del control ( $P > 0.001$ ); la proporción sexual (H/M) se redujo de 3 ♀:1 ♂ en el control a 1.4 ♀:1 ♂ en el grupo tratado con 80 mg kg<sup>-1</sup> de MT. La concentración de esteroides de 80 mg kg<sup>-1</sup> no causó mortalidad a los

alevines; sin embargo, en las concentraciones superiores la mortalidad aumentó en grado variable con un máximo de 13 % en el grupo dosificado con 400 mg kg<sup>-1</sup> de MT.

El análisis histológico comprobó que los esteroides tienen un efecto inductor sobre el sexo de las gónadas (carácter sexual primario). Cuando se suministró EE, dos tercios de la progenie se diferenciaron como hembras WZ, siguiendo su programa genético normal (igual que el control); del tercio restante, aproximadamente el 79% adquirió el sexo primario (♀♀) como consecuencia del efecto inductor del EE, en contra de su programa genético, determinado por los cromosomas ZZ (♂♂). El mayor éxito en la conversión sexual correspondió a los peces tratados con 160 mg kg<sup>-1</sup> de EE, donde el 100% de la fracción ZZ de los alevines se transformaron en hembras. Cuando se suministró MT, un tercio de la progenie se diferenció como machos ZZ, siguiendo su programa genético normal (igual que el control), los otros dos tercios de los alevines (WZ) se transformaron por el efecto inductor de la MT, y de estos, aproximadamente el 85% fueron machos (WZ♂♂); los restantes desarrollaron gónadas intersexuadas (WZ♀♂). El mayor éxito en la transformación ocurrió con los tratamientos de 120 y 160 mg kg<sup>-1</sup>, donde el 88% de la fracción WZ se convirtió en macho (WZ) y la mortalidad fue de 6.5 y 1.6% respectivamente.

La dosificación de los alevines de *P. sphenops* con EE y con MT produjeron alteraciones en el tejido ovárico, lo cual se acentuó en proporción directa a la alta concentración del esteroide. La tendencia general se puede resumir en tres procesos de desarrollo principales: ovarios o testículos con distintos grados de alteración (todas las concentraciones), gónadas que resistieron la transformación, pero con diferentes grados de alteración, y gónadas intersexuadas con un predominio de tejido espermático (en 200 y 400 mg kg<sup>-1</sup> con EE y en todas las concentraciones con MT). La longitud total de los organismos expuestos a los diferentes tratamientos indicó que con la MT el crecimiento se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) en comparación con el control y con los organismos que recibieron EE. Las aletas y las proporciones anatómicas de los peces expuestos al efecto de MT resultaron con alteraciones morfológicas importantes, principalmente asociadas con la región cefálica y las aletas dorsal y anal.

Los resultados obtenidos indican que el sexo de *P. sphenops* se puede inducir de manera efectiva controlando el pH y la temperatura o suministrando esteroides sexuales. En consecuencia, la aplicación de los resultados de esta investigación pueden inducir el sexo más vistoso de esta especie ornamental, ya sea exponiendo a los peces a las hormonas como tradicionalmente se ha hecho o modificando las condiciones ambientales como se comprobó en este trabajo.

## ii. ABSTRACT

The expression of sex plays an important role in the biology of a species due to important differences in relation to growth rate, behavior, reproductive age, coloration, size and body form within the sex. The weak nature of the sex determination in fishes combined with the knowledge of the reproduction processes has favored the development of sex induction techniques, which are essential to the development of fish culture.

In this study the sexual proportion of the live bearing fish *Poecilia sphenops* were evaluated in relation to temperature, pH and the oral administration of some steroids.

In order to understand the effects of the environmental factors on the sex ratio of *P. sphenops*, 18 groups each one comprised of four virgin females and two sexually active males were cultured in different temperature (22, 26 and 30 °C) and pH (6.0, 7.0 and 8.0) combinations. The results indicated that the sex of these fish depended on the interaction of these factors ( $P < 0.001$ ). In all combinations, the number of females was superior to that of males and the lesser proportion was obtained at combinations of 22 and 30 °C and pH 7 in comparison to females at combinations of 22 and 26 °C and pH 8. The only condition in which the sex ratio had come close to the unit was at 22 °C and pH 8.0. As opposed to the results published for other species of Poeciliidae, it was observed that a combination of high temperature (30 °C) and pH 6 and 7 induced a higher proportion of females.

To induce sex in the fry, it was necessary to feed them during forty days with an enriched steroid diet with 17  $\alpha$  ethynilestradiol (EE) or 17  $\alpha$  methyltestosterone (MT) at 0, 80, 120, 160, 200, 400 and 800 mg kg<sup>-1</sup>. The frequency in which female and male were observed in the treated fish with EE was different than that of the control group with a proportion of three females to one male ( $P < 0.001$ ). In a lower EE concentration (80 mg kg<sup>-1</sup>) the proportion of females was duplicated with respect to the control group (6.6♀:1♂). The frequency of male and female treated with the different concentrations of hormones did not reveal significant differences ( $P > 0.05$ ); a gradual increment in female proportion (H/H+M) of 0.76 in the control group, to 1.0 when the EE concentration was at 400 mg kg<sup>-1</sup> was observed. When 800 mg kg<sup>-1</sup> of EE was administered 100% mortality was observed.

With reference to MT, the frequency of males and females was different from the control group ( $P > 0.001$ ); the sex ratio (F/M) was reduced to 3♀:1♂ in the control group to 1.4♀:1♂ in the group treated with 80 mg kg<sup>-1</sup> of MT. The concentration of steroids at 80 mg kg<sup>-1</sup> did not cause mortality of the fry, although higher concentrations causes mortality at a variable rate with a maximum of 13% in the group treated with 400 mg kg<sup>-1</sup> of MT.

The histological analysis proved that the steroids had a sex induction effect on the gonads (primary sexual trait). When EE was administered, two-thirds of the species was differentiated as females WZ, continuing with their normal genetic program (same as the control group); the latter third, approximately 79% acquired the primary sex (♀♀) as a consequence of the inductor effect of EE against their normal genetic program, determined by the ZZ chromosomes (♂♂). The greatest success in the sex induction corresponded to the fish treated with 160 mg kg<sup>-1</sup> of EE, where 100% of the ZZ fraction of fry transformed into females. When MT was administered, one third of the individuals was differentiated as males ZZ, continuing with their normal genetic program (same as in the control group), the other two thirds of fry (WZ), transformed due to the effect of MT, and these, approximately 85% were male (WZ♂♂); the remaining fry developed intersex gonads (WZ♀♂). The greatest success occurred in the treatments of 120 and 160 mg kg<sup>-1</sup>, where 88% of the WZ fraction converted to male (WZ) and the mortality was 6.5 and 1.6% respectively.

*P. sphenops* fry treated with EE and MT produced alterations in the ovary tissue, which was increased in direct proportion to the high steroid concentration. The general trend could be summarized into three principal developmental processes: distinct levels of alteration to ovaries and testicles (in all concentrations), gonads that resisted transformation but with different levels of alteration and intersexes gonads with predominant spermatic tissue (in 200 and 400 mg kg<sup>-1</sup> with EE as well as in all the MT concentrations). The total length of the test individuals exposed to the different treatments indicated that, with MT, the growth reduced significantly ( $P < 0.05$ ) in comparison to the control group and those specimens that received EE. The fins as well as the anatomical proportions of the fish exposed to the effect of MT resulted in important morphological alterations, principally associated with the cephalic region as well as the dorsal and anal fins.

The results obtained indicate that the sex of *P. sphenops* could be effectively induced by controlling the pH and the temperature or by administering sexual steroids. In conclusion the application of the results of this study may serve to induce the sex most conspicuous ornaments of the species, through exposure to hormones as was traditionally done or by modifying the environment as was shown in this work.

## I. INTRODUCCIÓN

Los vertebrados han desarrollado mecanismos reproductores muy variados como una respuesta de adaptación a la gran diversidad de condiciones ambientales en las que habitan, por ello ocupan un lugar preponderante en la biología de los organismos. Asimismo, la reproducción es fundamental en la herencia de los caracteres y en los procesos evolutivos (Blackwelder y Shepherd, 1981).

La palabra reproducción se refiere a la producción de nuevos individuos de una especie, no obstante, este hecho entraña un complejo conjunto de procesos genéticos, fisiológicos y de comportamiento.

Los peces teleósteos con más de 20000 especies, constituyen uno de los grupos de animales más diversos, así también son diversas sus formas de reproducción. Muchas especies son gonocóricas o dioicas, donde cada individuo posee un fenotipo sexual estable; menos comunes son las especies hermafroditas asincrónicas protándricas como *Amphiprion clarkii* (Hattori, 1994) o protoginas como *Centropyge potteri* (Jobling, 1995). En otras, en la misma gónada existen células germinales masculinas y femeninas que maduran simultáneamente y el organismo se reproduce por autofecundación como *Rivulus marmoratus* (Chan y Wai-Sum, 1981). También hay especies ginogenéticas unisexuales, en las cuales el genoma de la progenie es enteramente de origen materno como en *Poecilia formosa* y *Poeciliopsis gracilis* (Miller y Schultz, 1959; Hoar, 1969).

La mayoría de los peces son ovíparos, donde la fecundación y el desarrollo son externos y un gran número de huevos son liberados al medio sin ningún cuidado de los padres o con distintos grados de atención a éstos, las larvas o los alevines. Menos comunes son los peces vivíparos, donde la fecundación es interna y los machos tienen estructuras intromitentes especializadas. El

desarrollo embriológico interno puede involucrar algunas adaptaciones especializadas para la nutrición y la respiración (Balon, 1975; 1981).

El sexo de los peces, al igual que en otros organismos, es generalmente determinado por el material genético aportado por los progenitores. A diferencia de las aves y los mamíferos, en la mayoría de los peces existe un sistema primitivo de determinación cromosómica del sexo, en el cual los cromosomas sexuales no son heteromórficos (Kirpichnikov, 1981). Se conocen diferentes sistemas de determinación del sexo, en los que participan dos cromosomas, ♀XX-♂XY (como en los mamíferos) y ♀WZ-♂ZZ (como en las aves); cromosomas múltiples, ♀X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>-♂X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y, ♀ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub>-♂ZZ y ♀XX-♂XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>; un solo cromosoma, ♀XX-♂X0 y ♀Z0-♂ZZ; tres cromosomas WXY, (♀XX, ♀WX, ♀WY)- (♂XY, ♂YY) (Jobling, 1995). En teoría, la determinación y diferenciación sexual son dos procesos diferentes; sin embargo, en la práctica no lo son, particularmente en el caso de los peces, donde el destino de las células germinales no está totalmente determinado por el sexo genético (Adkins-Regan, 1987).

Se ha demostrado que el sexo de los peces puede cambiarse si durante una etapa sensible del desarrollo cercana a la eclosión los organismos se exponen a diferentes factores ambientales, principalmente, la temperatura de confinamiento, el fotoperiodo, la salinidad y el pH (Rubin 1985; Sullivan y Schultz, 1986; Jobling 1995). En *Menidia menidia* la interacción del genoma y el ambiente determinan el sexo, de manera que las temperaturas frías producen más hembras y las temperaturas cálidas producen más machos (Conover y Kinard, 1981; Schultz, 1993; Jobling, 1995).

Las gónadas de los peces, al igual que las de otros vertebrados se originan en el epitelio dorsolateral de la cavidad abdominal y su desarrollo está íntimamente asociado con el del sistema renal. Las células germinales, que originan a los ovocitos y a los espermatozoides, se forman fuera de la cresta

genital y durante el desarrollo embrionario migran desde el endodermo del saco vitelino hasta la cresta germinal por varias rutas, incluyendo el pedúnculo del saco vitelino y los vasos sanguíneos; la tinción típica con la fosfatasa alcalina ha permitido su identificación fácil y rápida en estos tejidos. Durante su migración, algunas células germinales se pierden entre los tejidos y finalmente degeneran (Austin *et al.*, 1981)

Las crestas germinales crecen y se transforman en los primordios gonadales: el córtex y la médula. A diferencia de los elasmobranquios y de los tetrápodos, las gónadas de los peces teleósteos se desarrollan a partir de un solo primordio que es equivalente al córtex de otros vertebrados (Hoar, 1969) y que contiene las células germinales que darán origen a las células reproductoras femeninas o masculinas. La ambivalencia de este primordio ha llevado a algunos autores a suponer que ésta puede ser la causa del hermafroditismo y de la labilidad del sexo entre los peces (Hoar, 1969; Hunter y Donaldson, 1983; Adkins-Regan, 1987).

Aún cuando el sexo de un organismo se define por la unión de los gametos masculino y femenino, por un periodo del desarrollo ontogénico no existe manifestación alguna de este hecho hasta que el programa genético inicia la diferenciación y se forma un ovario o un testículo. Los mecanismos de diferenciación de la gónada no se conocen. Al respecto, Yamamoto (1969) propuso que los genes sexuales no son los determinantes sexuales directos, ya que hay otros factores inductores como los esteroides sexuales que intervienen en la diferenciación. Esta teoría se sustenta en los resultados exitosos de la inducción sexual experimentada en diferentes organismos después de la exposición a los esteroides sexuales y también en el hallazgo de la enzima  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSDH en las gónadas embrionarias de algunos elasmobranquios como *Scyliorhinus caniculas*, *S. stellaris* y *Torpedo marmorata*; esta enzima participa en la conversión de prognenolona en progesterona, que es la hormona precursora de los estrógenos (estronea y

estradiol) y andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) (Mathews y Holde, 1996).

La hipótesis del inductor sexual no explica por completo el fenómeno, ya que la síntesis de esteroides no se ha detectado en todos los casos de las gónadas embrionarias analizadas o sólo se detecta después que ha ocurrido la diferenciación sexual. La teoría propuesta por Yamamoto (1969) es una alternativa a la de Witschi (1967), que establecía que una sustancia de origen protéico era la responsable de inducir la diferenciación del sexo. Watchel y Koo (1981) revisaron la evidencia encontrada por diferentes autores sobre la existencia de un sistema inmunológico que fue detectado en experimentos de trasplante de tejidos entre mamíferos que resultó estar íntimamente asociado con el cromosoma Y de los machos, o más generalmente, con el cromosoma sexual del sexo heteromórfico (Y en ♂XY y W en ♀WZ), el producto del gen se denominó antígeno H-Y. Se ha demostrado en diferentes vertebrados incluyendo el hombre, que la presencia del antígeno H-Y induce la diferenciación del sexo. Actualmente existe un cúmulo de evidencia que apoya esta hipótesis (Zaborski, 1982); sin embargo, en el caso de los peces no se ha confirmado que este tipo de diferenciación se presente en la gran diversidad de formas de reproducción que existen.

Como antes se mencionó, la diferenciación del sexo en los peces tiene un alto grado de labilidad. Tomando en cuenta esta característica, se han desarrollado diferentes técnicas de control sexual, principalmente en lo referente a la manipulación cromosómica y al control fisiológico del sexo a través de esteroides sexuales. Para la manipulación cromosómica se utilizan los choques térmicos, lo que produce gametos poliploides, es decir, con número cromosómico superior a  $2n$ . También se emplean la irradiación de gametos y los choques de presión, lo que induce ginogénesis artificial en la

que no existe participación genética del macho y las crías resultan hembras (Yamazaki, 1983; Pandian, 1993).

El éxito en la reversión fisiológica del sexo dependerá en cierta medida del momento en que se suministre la dosis adecuada del agente transformador. Yamazaki (1983) y Piferrer y Donaldson (1992) han demostrado que existe una etapa durante el desarrollo de un organismo en que las gónadas son especialmente sensibles al efecto inductor de los esteroides sexuales.

La proporción natural de sexos es el criterio básico utilizado para evaluar el éxito de la reversión en organismos tratados con esteroides sexuales, de manera que la variación observada en la proporción sexual será atribuible al efecto del tratamiento inductor. En los peces, la proporción sexual más comúnmente observada es producto de la composición genotípica de los progenitores de un macho YY por cada hembra XX (Yamazaki, 1983), aunque Breder y Coates (1932) encontraron en *Lebistes reticulatus* (sin. *Poecilia reticulata*) que la proporción sexual fue de un macho y dos hembras.

Farr (1981) señaló que aunque la composición primaria de los sexos (al momento de la fertilización) no ha sido estudiada, la proporción sexual secundaria (al momento del parto) ha sido evaluada como 1:1 y no debe ser muy diferente de la primaria.

Cuando se suministran esteroides también se pueden producir efectos no deseables, entre los que destacan la disminución del crecimiento, la alteración del tejido ovárico y testicular, esterilidad y la ocurrencia de altos porcentajes de mortalidad (Hunter y Donaldson, 1983).

Hamaguchi y Egami (1980) aplicaron un tratamiento de metiltestosterona a una concentración de  $30 \mu\text{g g}^{-1}$  de alimento durante 137 días a juveniles de *Poecilia formosa* con la finalidad de inducir la generación de machos

(neomachos) en una población natural de puras hembras, pero únicamente observaron transformaciones importantes en la estructura de la aleta anal y alteraciones en los ovarios, pero no ocurrió desarrollo del tejido espermático. En contraste, Takahashi (1975a, b) logró un 100% de reversión de hembras a neomachos en *Poecilia reticulata* aplicando una dosis prenatal de 11-ketotestosterona a una concentración de 400 mg kg<sup>-1</sup> de dieta durante 8 a 10 días a las hembras grávidas. El mismo autor (1975c), logró la reversión de machos a neohembras administrando etinilestradiol a una dosis de 120 mg kg<sup>-1</sup> de dieta por un mes a la progenie recién nacida.

La expresión del sexo tiene un gran significado en la biología de una especie ya que existen importantes diferencias en las tasas de crecimiento, patrones de comportamiento, momento de ocurrencia de la reproducción, coloración, forma y tamaño entre los sexos (Yamasaki, 1983). El conocimiento de los fenómenos que interactúan sobre los procesos reproductivos en conjunto con las técnicas de inducción sexual son esenciales para impulsar el desarrollo de sistemas de producción piscícola con base en poblaciones monosexuales. Al utilizar técnicas simples que faciliten el desarrollo de esta actividad, se incrementarán los beneficios y minimizarán los costos.

Al respecto, México es un país con una gran riqueza de peces ornamentales entre los que se destaca la familia Poeciliidae, que comprende un grupo de especies que se distribuyen en América desde el Oeste de Ecuador y Norte de Argentina hasta los Estados de Delaware, Illinois y Arizona en Estados Unidos de Norteamérica (Darlington, 1957). Los pecílidos viven en una amplia variedad de ambientes, tienen gran tolerancia térmica, habitan desde las zonas templadas donde el agua se cubre de hielo, hasta las aguas termales con temperaturas de 42 a 44 °C. Sus hábitos alimenticios son variados porque hay especies piscívoras, omnívoras o herbívoras; algunas son selectivas, mientras que otras son oportunistas. Toleran muy bajas concentraciones de oxígeno disuelto y pueden respirar oxígeno del aire.

Típicamente habitan pequeños cuerpos de agua someros o áreas marginales de lagos y ríos; también habitan ambientes marinos e hipersalinos. Este grupo de peces, tiene la capacidad de colonizar una gran variedad de ambientes, producto de su amplia tolerancia ambiental, que les confiere grandes posibilidades de dispersión. Su forma peculiar de reproducción vivípara, con sus diferentes grados de especialización (almacenamiento de esperma, superfecundación) los faculta para que una sola hembra fecundada, pueda colonizar un nuevo hábitat y fundar una población exitosamente (Meffe y Snelson, 1989).

Algunas de las especies de la familia han sido ampliamente estudiadas, aunque son escasos los conocimientos que se tienen sobre los requerimientos de *P. sphenops*, que es una especie eurihalina, que se puede encontrar desde 0 a 135 ‰ de salinidad; habita pequeños arroyos y pozas someras, prefiere fondos rocosos cubiertos de algas filamentosas, diatomeas, microorganismos, fragmentos vegetales en descomposición y exhibe una amplia tolerancia a la turbidez (Darnell, 1962).

Con base en lo expuesto, esta investigación se hizo con el propósito de controlar la proporción sexual de poblaciones cultivadas de *P. sphenops* y se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Estudiar el efecto inductor de la temperatura y el pH sobre la proporción sexual de *P. sphenops*
- Estudiar el efecto del  $17\alpha$  etinilestradiol y de la  $17\alpha$  metiltestosterona sobre la proporción sexual, la estructura histológica de las gónadas, el crecimiento y la morfología de *P. sphenops*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

*Poecilia sphenops*, una de las especies de mayor talla dentro de la familia Poeciliidae, se distribuye en el Atlántico Mesoamericano desde Costa Rica hasta 48.3 km al norte de la ciudad de Veracruz, México y en el Pacífico desde Costa Rica hasta Aguililla, Michoacán, México (Fig. 1) (Miller, 1966). Los ejemplares juveniles y adultos de *P. sphenops* utilizados en este trabajo se recolectaron durante el verano de 1995 en la represa Piedra Azul, en la comunidad de Teotitlán del Valle (17° 02' Lat. N. y 96° 30' Long. O.), Municipio de Tlacolula, Estado de Oaxaca, México (Fig. 1). La muestra recolectada se identificó por medio de las claves de Álvarez (1970) y posteriormente se colocó en un estanque de mantenimiento de fibra de vidrio de 1500 l con recambio constante de agua biológicamente filtrada (1 l h<sup>-1</sup>). Los organismos han permanecido en el laboratorio durante cinco años expuestos a las condiciones ambientales de la región norte de Baja California, México. Durante este periodo los peces se alimentaron con la dieta comercial para bagre PURINA (Tabla 1) y adicionalmente se alimentaron de la producción natural de algas que crecieron en el estanque. De esta población se recolectaron los organismos empleados en los diferentes experimentos.

Con el fin de conocer el efecto conjunto de la temperatura (22, 26 y 30 °C) y el pH (6.0, 7.0 y 8.0) sobre la proporción sexual de *P. sphenops*, se distribuyeron por triplicado grupos de 4 hembras vírgenes y 2 machos sexualmente activos (proporción 2:1) en cada una de las combinaciones de pH-temperatura (9 x 3= 27 grupos; ♀= 108; ♂= 54). El intervalo de masa para hembras y machos fue de 0.81-1.48 g y 0.36-0.63 g respectivamente (Tabla 2). Los grupos de organismos se colocaron de manera aleatoria en acuarios de 20 l. Los acuarios se colocaron en un estanque rectangular termorregulado con un calentador sumergible de 1000 W y un control

electrónico ajustaba las temperaturas experimentales ( $ES \pm 0.03 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Fig. 2). El pH del agua se modificó con fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) o bicarbonato de sodio (Rubin, 1985), el oxígeno disuelto se mantuvo en promedio en  $6.85 \pm 0.21 \text{ mg l}^{-1}$ , la alcalinidad en  $143 \pm 39.23 \text{ mg CaCO}_3 \text{ l}^{-1}$  y la dureza en  $318 \pm 26.3 \text{ mg CaCO}_3 \text{ l}^{-1}$ . Los peces fueron alimentados con una dieta comercial (45% de proteína; Tabla 3) a razón del 5% del peso húmedo corporal.

Durante once días ocurrió el apareamiento de los peces, después de lo cual se retiraron los machos. Las hembras permanecieron en los acuarios el tiempo necesario para que se produjera la gestación y una vez ocurrido el parto también se retiraron de los acuarios. Para evitar el canibalismo durante el parto, las hembras se confinaron en cajas de plástico diseñadas para que los alevines escaparan de la depredación materna (Fig. 2B). El desarrollo de los alevines se llevó a cabo bajo el efecto de las diferentes condiciones de pH y temperatura, hasta que se observó la aparición del gonopodio y el comportamiento reproductivo característico de los machos (Balsano *et al.*, 1985; Fig. 3), momento en el cual se terminó el experimento. La proporción de hembras y de machos de cada una de las condiciones de cultivo se analizó empleando una tabla de contingencia tridimensional (Zar, 1984).

Una vez que se conoció el efecto del pH y la temperatura sobre la proporción sexual de *P. sphenops*, se estudió el efecto inductor que tienen los esteroides  $17 \alpha$  etinilestradiol y  $17 \alpha$  metiltestosterona sobre el sexo. Un grupo de 120 hembras juveniles de *P. sphenops* se mantuvo en un estanque de 400 l hasta que maduraron sexualmente a una temperatura constante de  $28 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Después, se colocaron grupos de tres hembras vírgenes ( $1.78 \pm 0.04 \text{ g}$ ) con dos machos adultos que tenían un comportamiento sexual activo ( $0.78 \pm 0.03 \text{ g}$ ) en 40 acuarios de 20 l sumergidos en cuatro estanques circulares de 400 l (Fig. 4). Las características fisicoquímicas del agua fueron  $28.3 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH de  $7.9 \pm 0.01$  y oxígeno disuelto de  $6.48 \pm$

0.08 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> (Tabla 4). Diariamente se recambió el 100 % del agua de los acuarios y los peces se alimentaron con una ración equivalente al 5% de la masa húmeda corporal. El fotoperíodo se mantuvo en 12 : 12 h luz – oscuridad. Después de 10 días ocurrieron los apareamientos y se retiraron los machos de los acuarios. Durante la gestación, las hembras se confinaron en cajas de plástico flotantes diseñadas para que los alevines escaparan de la depredación materna; una vez terminado el parto, las hembras también se retiraron de los acuarios (Fig. 2B). A los alevines recién nacidos se les suministró durante 40 días alimento enriquecido con los esteroides sexuales 17  $\alpha$  etinilestradiol (EE) (Sigma E 4876) para inducir la diferenciación de las hembras y 17  $\alpha$  metiltestosterona (MT) (Sigma M 7252) para la inducción de los machos.

Los esteroides se agregaron al alimento en solución alcohólica, la cual se roció de manera homogénea sobre las hojuelas del alimento colocadas en un vaso de precipitado y durante el proceso de adición se mezclaron vigorosamente con un agitador automático; posteriormente el alcohol se evaporó a temperatura ambiente. Las concentraciones de esteroides empleadas tanto de EE como de MT fueron 80, 120, 160, 200, 400 y 800 mg kg<sup>-1</sup> y se mantuvieron en refrigeración. Se preparó una dieta control siguiendo el procedimiento descrito con alcohol absoluto pero sin esteroides.

Con el alimento enriquecido proporcionado a los alevines se inició un experimento factorial de 2 x 6 con tres repeticiones para cada una de las seis concentraciones de las dos hormonas (N=36) y el control (N=4).

A los alevines se les alimentó, a razón del 5% de su peso húmedo corporal, calculado de acuerdo con la relación masa (g) - longitud (mm) a partir de una muestra de 136 ejemplares con una longitud patrón (LP) entre 6.7 y 120 mm:

$$M = 1.42 \times 10^{-5} + LP^{3.15} \quad (1)$$
$$r^2 = 0.99$$

donde: M =masa, LP= longitud patrón.

Transcurrido el periodo de exposición a los esteroides, los peces se siguieron alimentando con la dieta comercial y el experimento se dio por concluido cuando se observó la formación del gonopodio y el comportamiento reproductivo característico de los machos (Balsano *et al.*, 1985) ( Fig. 3). En todo el periodo experimental se registró la mortalidad y con base en los caracteres sexuales secundarios se calculó la frecuencia de hembras y machos de cada una de las condiciones de cultivo.

Con el fin de conocer si existían diferencias entre los tratamientos se empleó el análisis de contingencia (2 x 7) y de  $X^2$  (Zar, 1984).

En muestras de 15 organismos de cada uno de los tratamientos y del control ( $N_{Total} = 180$ ) se realizó un análisis histológico de las gónadas con el fin de confirmar el sexo de los peces expuestos a los esteroides; también se hizo para estudiar el efecto de la MT y del EE que se comparó con el control. Este análisis se efectuó disecando la masa visceral incluidas las gónadas y se fijaron en solución de Davidson (NOAA, 1983), deshidratadas a través de una serie de alcoholes e incluidas en parafina. Se cortaron secciones de 4  $\mu m$  de grosor que se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los cortes se observaron en un microscopio compuesto Olympus BH2 equipado con un filtro azul LBD en la fuente de luz.

Con base en los resultados del análisis histológico de las gónadas, la frecuencia de hembras, machos y organismos intersexuados resultantes se compararon por separado mediante un análisis de contingencia (3 x 7) y las diferencias se comprobaron con un análisis de  $X^2$  (Zar, 1984).

Para estudiar los efectos secundarios de los tratamientos con las hormonas se analizó la morfología de los peces, para lo cual se evaluaron las relaciones entre la concentración de los esteroides sexuales suministrados, el crecimiento y el grado de deformación morfológica; se tomaron 14 caracteres morfométricos de *P. sphenops* (Fig. 5) de 15 ejemplares elegidos al azar de cada una de las repeticiones de los 12 tratamientos incluyendo el control (N = 180).

La longitud total de los peces se comparó con un análisis de varianza y las diferencias de crecimiento para cada tratamiento ( $P < 0.05$ ) se contrastaron con una prueba de Tukey de comparación múltiple (Zar, 1984). Para conocer la similitud de las proporciones corporales entre los grupos de organismos expuestos el efecto de los esteroides, se hizo un análisis de clasificación numérica tomando como criterio de aglutinación la distancia euclidiana (Gauch, 1984).



Figura 1. Distribución geográfica de *Poecilia sphenops* en América (líneas diagonales punteadas) y localización geográfica de Teotitlán del Valle (sitio de recolección) en el Estado de Oaxaca.

Tabla 1. Composición proximal porcentual del alimento comercial para bagre , suministrado a los adultos de *Poecilia sphenops*. ELN = extracto libre de nitrógeno calculado por diferencia.

COMPONENTE	CONTENIDO (g kg <sup>-1</sup> )
Proteína mínimo	320.0
Grasa mínimo	35.0
Fibra máximo	80.0
Humedad	120.0
Cenizas	100.0
ELN	327.0
Calcio	10.0
Fósforo	8.0

Tabla 2. Masa promedio (g) de los reproductores hembras (♀) y machos (♂) de *Poecilia sphenops* expuestos a diferentes temperaturas y pH.  $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ . (N= 162; 108 hembras y 54 machos).

Temperatura (°C)	pH	N	♀	♂
30	6	18	2.06 ± 0.04	1.06 ± 0.03
	7	18	1.99 ± 0.17	0.99 ± 0.04
	8	18	1.91 ± 0.22	1.44 ± 0.56
26	6	18	0.91 ± 0.05	0.53 ± 0.02
	7	18	1.04 ± 0.20	0.47 ± 0.08
	8	18	1.16 ± 0.16	0.48 ± 0.01
22	6	18	1.24 ± 0.20	0.45 ± 0.03
	7	18	1.15 ± 0.05	0.49 ± 0.04
	8	18	1.20 ± 0.14	0.45 ± 0.01

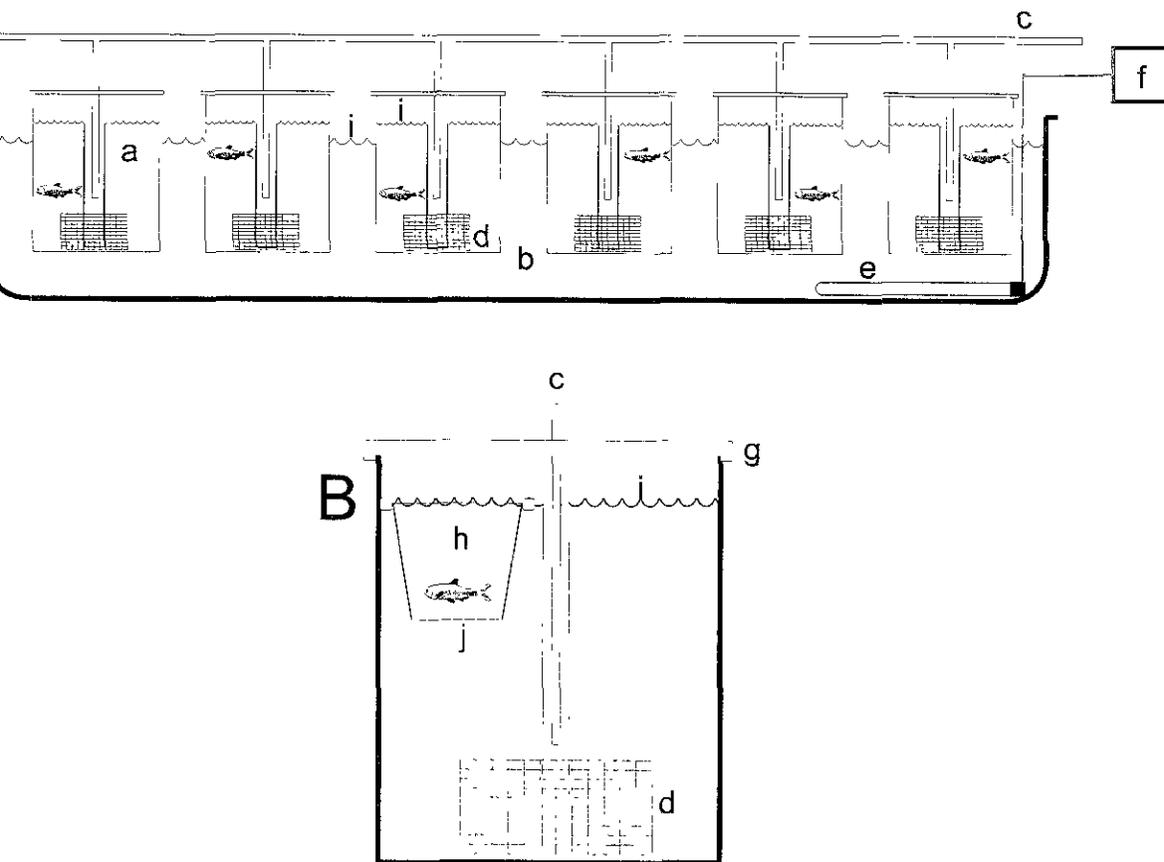


Figura 2. A. Dispositivo para cultivar *Poecilia sphenops*. B. Proyección del reservorio para las hembras grávidas. a, acuarios de 20 l; b, estanque termorregulado; c, suministro de aire; d, filtro de esponja; e, calentador; f, controlador de temperatura; g, tapa para acuario; h, caja de plástico para confinar a las hembras; i, nivel del agua; j, salida para los alevines.

Tabla 3. Composición proximal del alimento comercial TETRAMIN, suministrado a juveniles de *Poecilia sphenops*.

COMPONENTE	CONTENIDO (g kg <sup>-1</sup> )
Proteína cruda	450.0
Grasa cruda	50.0
Fibra cruda	20.0
Humedad máxima	60.0
Vitaminas (por cada 454 g de alimento)	200.0 mg kg <sup>-1</sup>

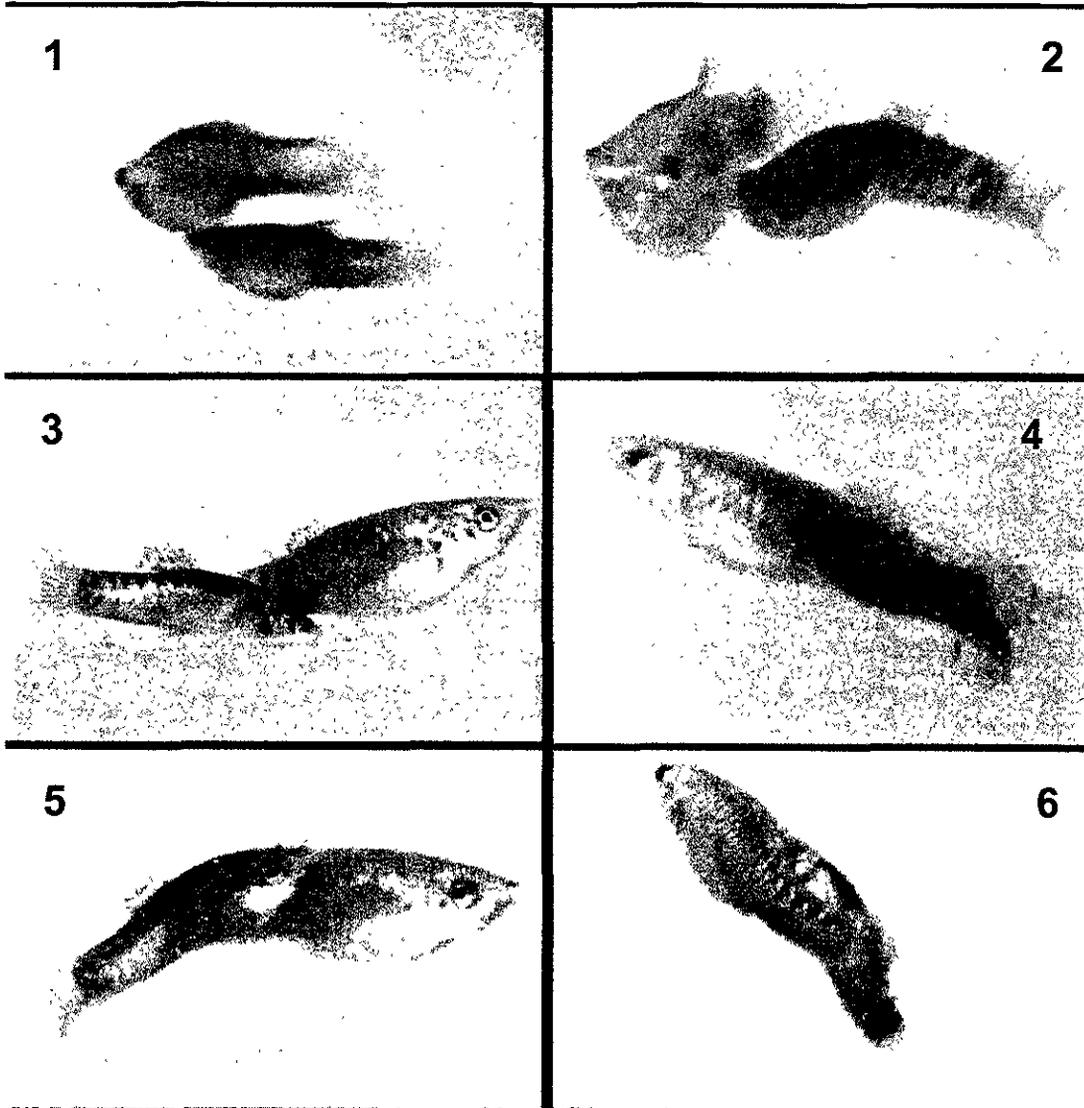


Figura 3. Comportamiento reproductivo observado en *Poecilia sphenops*. 1: Macho en persecución aproximándose por debajo del abdomen de la hembra. 2: Macho nadando junto a la hembra. 3: Macho olfateando la región genital de la hembra. 4 y 5: Macho empujando a la hembra en un intento de cópula. 6: Macho copulando a la hembra.

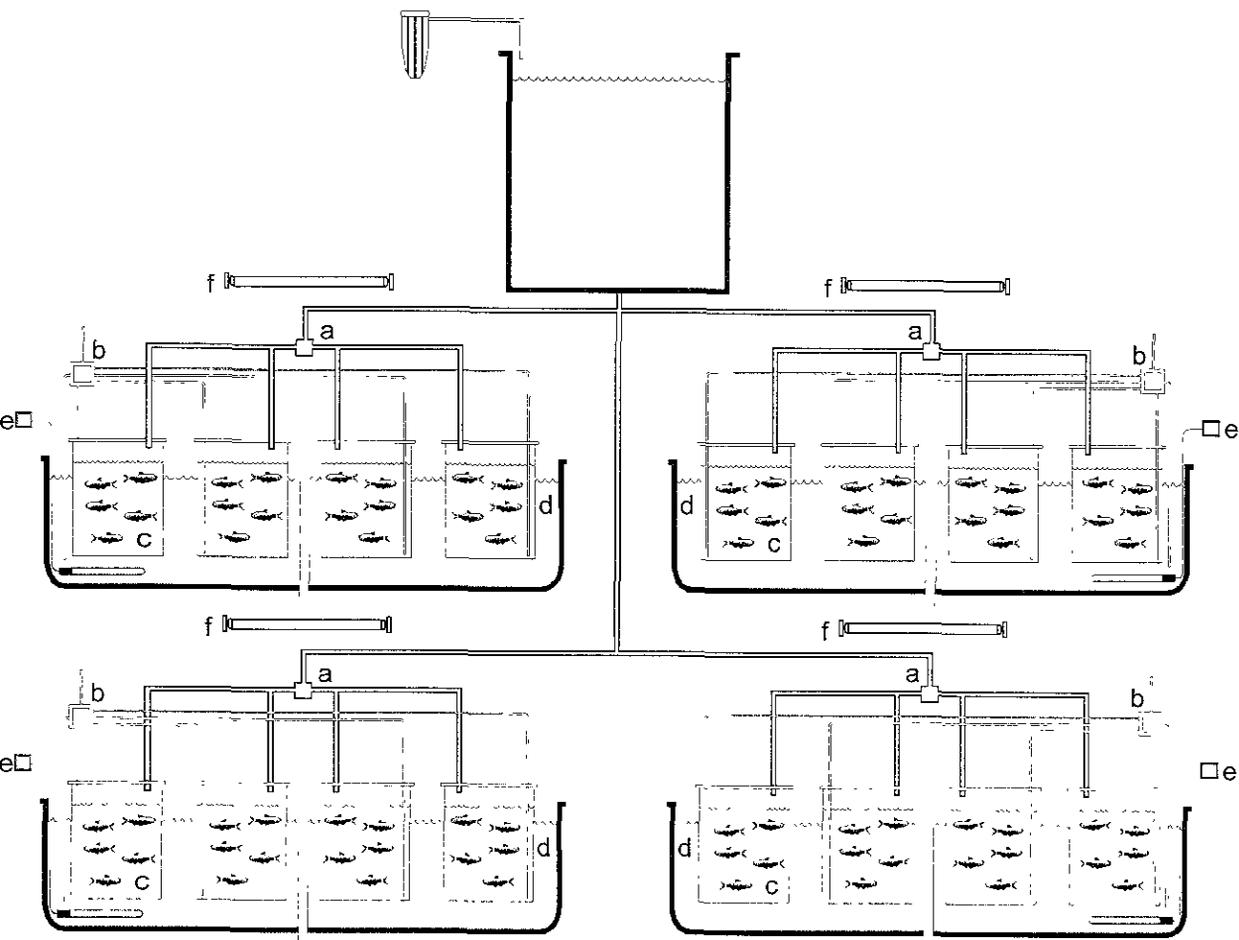


Figura 4. Esquema del dispositivo experimental para inducir el sexo de *Poecilia sphenops* con los esteroides sexuales  $17\alpha$  etinilestradiol y  $17\alpha$  metiltestosterona. a, red de tuberías para repartir el agua; b, red de tuberías para repartir el aire; c, acuarios con peces; d, estanque que contiene los acuarios; e, calentador de 1000 W con control electrónico; f, lámparas de neón.

Tabla 4. Características fisicoquímicas del medio de cultivo de *Poecilia sphenops*. mg kg<sup>-1</sup>=concentración de la hormona; CTRL = control; EE = 17  $\alpha$  etinilestradiol; MT = 17  $\alpha$  metilttestosterona; Valores  $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

Hormona (mg kg <sup>-1</sup> )	Oxígeno (mg l <sup>-1</sup> )	pH	Temperatura (°C)	
CTRL	0	6.45 $\pm$ 0.14	7.90 $\pm$ 0.02	28.2 $\pm$ 0.02
EE	80	6.50 $\pm$ 0.07	7.85 $\pm$ 0.07	28.1 $\pm$ 0.21
	120	6.41 $\pm$ 0.05	7.94 $\pm$ 0.02	29.0 $\pm$ 0.39
	160	6.51 $\pm$ 0.14	7.86 $\pm$ 0.02	28.0 $\pm$ 0.59
	200	6.54 $\pm$ 0.09	7.91 $\pm$ 0.01	28.5 $\pm$ 0.52
	400	7.62 $\pm$ 0.22	7.91 $\pm$ 0.03	28.2 $\pm$ 0.41
	800	6.71 $\pm$ 0.06	7.90 $\pm$ 0.03	27.6 $\pm$ 0.28
MT	80	6.75 $\pm$ 0.07	7.92 $\pm$ 0.00	27.8 $\pm$ 0.23
	120	6.43 $\pm$ 0.04	7.89 $\pm$ 0.03	29.1 $\pm$ 0.40
	160	6.67 $\pm$ 0.98	7.89 $\pm$ 0.02	28.1 $\pm$ 0.24
	200	6.61 $\pm$ 0.15	7.90 $\pm$ 0.03	28.1 $\pm$ 0.25
	400	6.60 $\pm$ 0.05	7.92 $\pm$ 0.01	28.4 $\pm$ 0.20
	800	6.41 $\pm$ 0.14	7.91 $\pm$ 0.01	28.8 $\pm$ 0.46

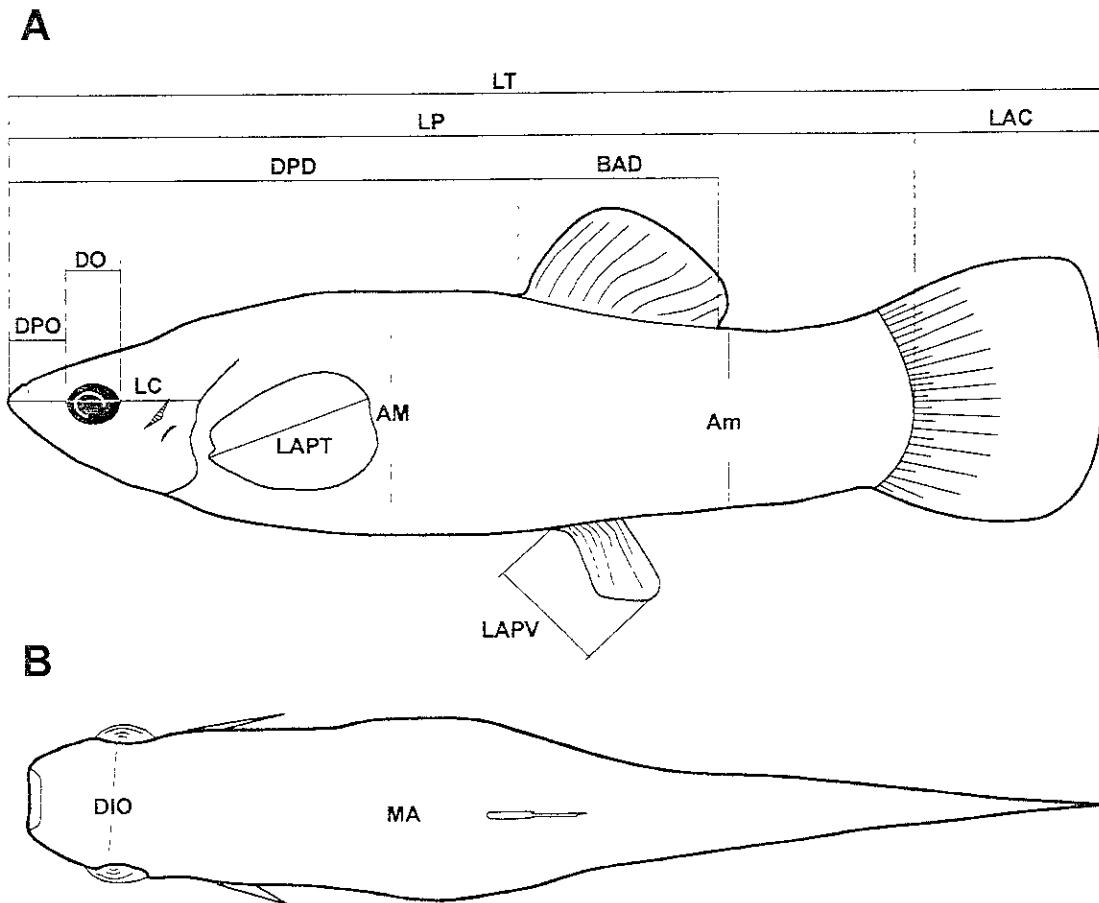


Figura 5. Diagrama de las características morfométricas de *Poecilia sphenops* consideradas para evaluar el efecto de  $17\alpha$  metiltestosterona y  $17\alpha$  etinilestradiol. A, Vista lateral; B, Vista dorsal. AM=altura máxima; Am=altura mínima; BAD=base de la aleta dorsal; DIO=distancia interorbital; DO=diámetro ocular; DPD=distancia predorsal; DPO=distancia preorbital; LAPT=longitud de las aletas pectorales; LAPV=longitud de las aletas pélvicas; LC=longitud cefálica; LP=longitud patrón; LAC=longitud de la aleta caudal; LT=longitud total; MA= ancho máximo.

### III. RESULTADOS

#### III.1 Efecto de la temperatura y el pH sobre la proporción sexual de *Poecilia sphenops*

Los progenitores fueron aclimatados durante 15 días a las condiciones de temperatura-pH; después del apareamiento que se llevó a cabo durante 11 días, la segunda generación nació, aproximadamente, después de 22, 10 y 11 días para 22, 26 y 30 °C de manera respectiva. El desarrollo de los alevines hasta la edad reproductiva demoró 151, 154 y 126 días para las mismas temperaturas.

El mayor número de alevines (hembras y machos) se obtuvo en pH 7 (N = 119,171 y 137) a 22, 26 y 30 °C respectivamente. Se observó un número reducido de organismos a 22 °C (N = 32) y 26 °C (N = 58) a pH 6, en tanto que a 30 °C el menor número de descendientes ocurrió a pH 8 (N = 83) (Tabla 5).

Los resultados indican que las proporciones sexuales se alteraron significativamente ( $P < 0.05$ ) y el sexo de *P. sphenops* es el resultado de la interacción de la temperatura y el pH ( $P < 0.001$ ). En todas las combinaciones de los factores ambientales ensayados, el número de hembras superó al de los machos y la menor proporción de machos se observó a 22 y 30 °C en pH 7. La única condición en la que la proporción sexual se aproximó a uno, fue en 22 °C y pH 8 (Tabla 5). En una de las repeticiones para la combinación 22 °C – pH 7.0 se observó un 100% de hembras en la progenie; sin embargo, la sobrevivencia para esta temperatura fué inferior a la registrada a 26°C, esta situación se agudiza cuando los valores del pH son extremos (6 y 8). En los tratamientos mantenidos a pH bajo (6.24 en promedio) se observaron las menores sobrevivencias.

Tabla 5. Composición sexual de los grupos de peces mantenidos en diferentes combinaciones de pH y temperatura ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ ). N = número total de alevines; ♂ = machos; ♀ = hembras.

Temperatura, °C	pH	N	♂	♀	♂:♀	♀:♂
22.56 ± 0.02	6.23 ± 0.03	32	5	27	0.19	5.40
	7.02 ± 0.02	119	13	106	0.12	8.15
	8.00 ± 0.01	78	32	46	0.70	1.44
26.00 ± 0.02	6.24 ± 0.01	58	12	46	0.26	3.83
	7.09 ± 0.01	171	33	138	0.24	4.18
	8.05 ± 0.02	104	39	65	0.60	1.67
29.74 ± 0.03	6.23 ± 0.01	130	20	110	0.18	5.50
	7.20 ± 0.01	137	13	124	0.10	9.54
	8.10 ± 0.04	83	20	63	0.32	3.13

### III.2 Inducción del sexo de *Poecilia sphenops* con 17 $\alpha$ etinilestradiol y 17 $\alpha$ metiltestosterona

Como resultado de la dosificación de EE y MT se produjeron cambios en las proporciones sexuales. El análisis de contingencia indica que la frecuencia de hembras y machos observada en los organismos tratados con EE difiere del control ( $P < 0.001$ ); la proporción sexual del control fue de tres hembras por cada macho (Tabla 6). En la concentración más baja de EE ( $80 \text{ mg kg}^{-1}$ ) la proporción de hembras se duplicó con respecto al control (6.6H:1M). Un segundo análisis de contingencia, considerando sólo las frecuencias de hembras y machos de las diferentes concentraciones de EE suministradas, no reveló diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, se observó un aumento gradual en la proporción de hembras con respecto al total de los organismos (H/H+M) de 0.76 en el control a 1.0 cuando la concentración de EE fue de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  (Tabla 6).

En las concentraciones bajas de EE de 80 a  $120 \text{ mg kg}^{-1}$ , ni en el control se observó mortalidad, pero en las concentraciones más altas la mortalidad se incrementó linealmente ( $M = 0.1472 \times \text{EE} - 18.122$ ;  $R^2 = 0.9985$ ). Con la dosis de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  la mortalidad fue 40.35% y con  $800 \text{ mg kg}^{-1}$  todos los organismos murieron.

Cuando se suministró MT, la frecuencia de machos y hembras fue diferente del control ( $P > 0.001$ ). En los alevines tratados con MT, la proporción sexual (H/M) se redujo y cambió de 3♀:1♂ en el control a 1.4 hembras por cada macho con la concentración de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  y en las concentraciones superiores ( $120$  a  $800 \text{ mg kg}^{-1}$ ) se observó que en todos los organismos la aleta anal se había modificado ( $n=262$ ) y aunque no se constituyó en un gonopodio bien desarrollado los organismos se clasificaron como machos. En los peces expuestos a concentraciones de 200 a  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de MT, se observó el desarrollo conspicuo de los tubérculos cefálicos, que normalmente se presentan en la región anterodorsal de la cabeza de los machos; en los

alevines expuestos a concentraciones de  $800 \text{ mg kg}^{-1}$  dichas estructuras no se desarrollaron.

La concentración de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  no causó mortalidad a los alevines. La conversión del sexo por el efecto de esta concentración sólo fue superior en un 17.8% con respecto al control. En las concentraciones superiores del esteroide, la mortalidad aumentó en grado variable y el máximo de 12.9% se observó con  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  (Tabla 6).

Al efectuar la disección de 15 organismos de cada uno de los tratamientos, se observó que algunos alevines que fueron tratados con EE, tenían los ovarios maduros y los ovocitos estaban en un estado avanzado de vitelogénesis, mientras que en otros, los ovarios eran sumamente pequeños para distinguir el sexo en un microscopio estereoscópico. Las gónadas de los organismos tratados con MT siempre fueron pequeñas, por lo que el sexo no se pudo reconocer en el microscopio.

El análisis histológico reveló que los esteroides tienen un efecto inductor sobre el sexo de las gónadas (carácter sexual primario) que no coincide con los caracteres sexuales secundarios. La proporción de hembras ( $H/H+M+I$ ) derivada del análisis histológico fue de 0.64 para el control (Tabla 7), ligeramente menor si se compara con el resultado obtenido del análisis de los caracteres sexuales secundarios para la misma condición (0.76) (Tabla 6). El análisis de contingencia comprobó que el suministro de EE no indujo cambios significativos en las frecuencias de los sexos cuando se comparan con el control ( $P>0.05$ ). Sin embargo, cuando los organismos fueron expuestos a concentraciones de 200 y  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de EE se detectaron gónadas masculinas e intersexuadas.

Al comparar la frecuencia de machos y hembras entre el control y los organismos expuestos al efecto inductor de la MT, el análisis de contingencia comprobó que hay diferencias significativas ( $P<0.001$ ), pero en una

comparación de las frecuencias sexuales entre las diferentes concentraciones de MT no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ). Entre los organismos expuestos a la MT no se observaron ovarios, pero en todas las concentraciones se observaron gónadas intersexuadas que representan el 14% de los organismos histológicamente analizados (Tabla 7).

Al relacionar la secuencia experimental esquematizada en la figura 6 con los resultados contenidos en la figura 7, se evidencia que los alevines expuestos al efecto del EE se diferencian en machos ZZ ( $\text{♂♂}$ ), hembras WZ ( $\text{♀♀}$ ), machos inducidos en hembras ZZ ( $\text{♀♀}$ ) y organismos intersexuados ZZ ( $\text{♀♂}$ ). Los alevines expuestos al efecto inductor de la MT se diferencian en machos ZZ ( $\text{♂♂}$ ), hembras convertidas en machos WZ ( $\text{♂♂}$ ) y organismos intersexuados WZ ( $\text{♀♂}$ ).

La proporción sexual observada en el control es de  $3♀:1♂$  (Tabla 6), es decir, un tercio de cada 10 organismos que nacen, portará los cromosomas ZZ y el resto tendrá la constitución WZ. Como lo ilustra la figura 7 (mitad superior), dos tercios de la progenie se diferencian como hembras WZ, siguiendo su programa genético normal (igual que el control), del tercio restante, aproximadamente el 79% adquiere el sexo primario ( $♀♀$ ) como consecuencia del efecto inductor del  $17 \alpha$  etinilestradiol [en contra de su programa genético determinado por los cromosomas ZZ ( $\text{♂♂}$ )]. El mayor éxito en la conversión sexual corresponde a  $160 \text{ mg kg}^{-1}$  de EE, donde el 100% de la fracción ZZ de los alevines se transformaron en hembras (ZZ) y la mortalidad fue sólo del 5%.

En la parte inferior de la figura 7 (tratamientos con MT) un tercio se diferencia como macho ZZ, siguiendo su programa genético normal (igual que el control), los otros dos tercios de los alevines (WZ), son transformados por el efecto inductor de la  $17 \alpha$  metilttestosterona, de estos, aproximadamente el 85% son machos (WZ  $\text{♂♂}$ ) y el resto desarrollaron gónadas intersexuadas

(WZ 26) El mayor éxito en la transformación ocurrió con los tratamientos de 120 y 160 mg kg<sup>-1</sup> donde el 88% de la fracción WZ se convirtió en machos y la mortalidad fue solamente del 6.5 y 1.6% respectivamente.

Tabla 6. Proporción sexual y mortalidad de *Poecilia sphenops* expuesta al efecto del 17  $\alpha$  etinilestradiol (EE) y de la 17  $\alpha$  metiltestosterona (MT). M= machos; H= hembras; m= mortalidad.

Tratamiento (mg kg <sup>-1</sup> )	Número de alevines	H	M	m	(H/H+M)	(M/H+M)	H/M	
Control	0	91	69	22	0	0.76	0.24	3.14
EE	80	61	53	8	0	0.87	0.13	6.63
	120	53	51	2	0	0.96	0.04	25.50
	160	67	61	1	5	0.98	0.02	61.00
	200	56	47	4	5	0.92	0.08	11.75
	400	57	34	0	23	1.00	-	-
	800	45	0	0	45	-	-	-
MT	80	57	33	24	0	0.58	0.42	1.37
	120	46	0	43	3	-	1.00	0
	160	64	0	63	1	-	1.00	0
	200	56	0	54	2	-	1.00	0
	400	62	0	54	8	-	1.00	0
	800	51	0	48	3	-	1.00	0

Tabla 7. Proporción sexual de *Poecilia sphenops* observada en los cortes histológicos de las gónadas después de la exposición al efecto del  $17\alpha$  etinilestradiol (EE) y de la  $17\alpha$  metiltestosterona (MT). M= machos; H= hembras; I= intersexuados.

Tratamiento	mg kg <sup>-1</sup>	Número de alevines	H	M	I	(H/H+M+I)	(M/H+M+I)	(I/H+M+I)	H/M
Control	0	14	9	5	0	0.64	0.36	0	1.80
EE	80	14	12	2	0	0.86	0.14	0	6.00
	120	13	11	2	0	0.85	0.15	0	5.50
	160	14	14	0	0	1.00	0	0	-
	200	14	12	1	1	0.86	0.07	0.07	12.00
	400	14	13	0	1	0.93	0	0.07	-
	800	todos muertos							
MT	80	6	0	5	1	0	0.83	0.17	0
	120	12	0	11	1	0	0.92	0.08	0
	160	13	0	12	1	0	0.92	0.08	0
	200	11	0	9	2	0	0.82	0.18	0
	400	5	0	4	1	0	0.80	0.20	0
	800	10	0	8	2	0	0.80	0.20	0



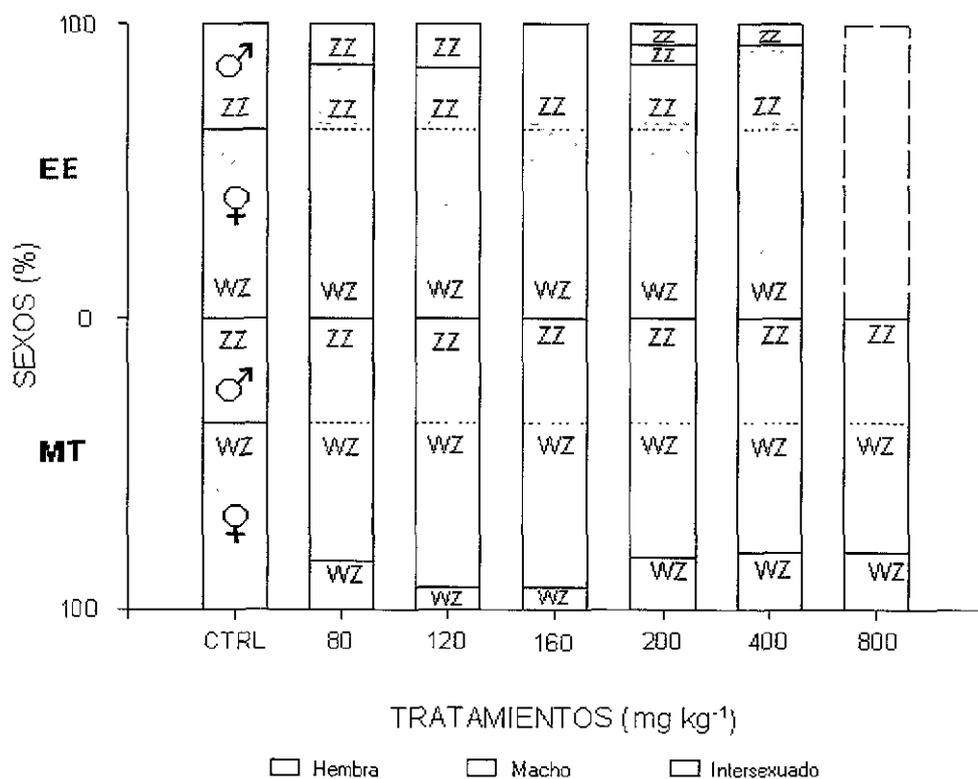


Figura 7. Proporción sexual de *Poecilia sphenops* expuesta a diferentes concentraciones de 17  $\alpha$  etinilestradiol (EE) y 17  $\alpha$  metiltestosterona (MT). WZ y ZZ indican la constitución cromosómica hipotética de los organismos.

### III.2.1 Efecto del 17 $\alpha$ etinilestradiol y la 17 $\alpha$ metiltestosterona en la estructura histológica de las gónadas de *P. sphenops*

Efectivamente, el 17  $\alpha$  etinilestradiol y la 17  $\alpha$  metiltestosterona inducen la transformación del sexo de los juveniles de *P. sphenops* y en sus gónadas se producen alteraciones que no corresponden a la estructura normal de los ovarios o de los testículos. El análisis microscópico del tejido gonadal de *P. sphenops* evidenció alteraciones que se incrementan en relación directa con la concentración de los esteroides suministrados a través de la dieta.

A continuación se analiza la estructura normal del ovario y del testículo de *P. sphenops* y se señalan las principales diferencias causadas por los esteroides EE y MT siguiendo el procedimiento experimental antes descrito (Fig. 6).

Las hembras normales de *P. sphenops* (control) tienen un solo ovario, ubicado en la región dorsal de la cavidad abdominal. En un organismo inmaduro, el ovario es un filamento delgado ubicado en la región dorsal de la cavidad abdominal. Cuando el organismo está maduro, la gónada ocupa gran parte del espacio abdominal desplazando a las vísceras en sentido anteroventral.

El ovario está cubierto externamente por un epitelio delgado (Fig. 8A, a) que en la región posterior de la gónada forma un conducto ovárico que internamente tiene un epitelio glandular que forma laminillas dispuestas longitudinalmente (Fig. 8A, recuadro). Internamente el ovario tiene una cavidad que lo recorre longitudinalmente y que se ramifica profusamente hasta alcanzar a cada ovocito en desarrollo (Figs. 8A y 8B, e). También hay una red vascular abundante asociada con cada ovocito (Fig. 8B, h). En la gónada se observa un epitelio germinal interno y ovocitos en diferentes estadios de desarrollo (vitelogénesis) con un núcleo conspicuo y varios

nucléolos (Fig. 8A, b, c, d). En los ovocitos en desarrollo hay una gran cantidad de vesículas que aumentan su diámetro en proporción directa con el crecimiento de la célula germinal.

En las figuras 9A y 9B se presenta un corte transversal de folículos ováricos donde se observa que la membrana de los ovocitos tiene proyecciones digitiformes que convergen con las células de la granulosa y forman la zona radiata (Fig. 9B, k). Aparentemente, esta zona se observa sobre toda la superficie del ovocito formando canales (Figs. 9A, j; 9A', j) que se asocian con las células foliculares. La granulosa (Fig 9B, l) está constituida por una sola capa de células. Las células tecales (Fig 9B, m) que son muy escasas constituyen el tejido intersticial asociado con los capilares sanguíneos (Figs. 9A, h y 9B).

En los machos normales de *P. sphenops* (control) existe un solo testículo, revestido por una delgada cubierta epitelial que en la región distal se transforma en un conducto deferente (Fig 10A, 1). En un corte histológico de la gónada se observa que las células germinales están organizadas por grupos en estructuras esféricas que constituyen los quistes (Figs. 10A y 10B, 7). Cada quiste está rodeado por una cubierta delgada de células muy planas, que corresponden a las células de Sertoli (Meffe y Snelson, 1989). Dentro de cada quiste las células espermáticas están en el mismo estadio de desarrollo y se diferencian de otros grupos porque en la medida que transcurre la maduración se reduce el diámetro, hasta que alcanzan su menor talla en el estadio de espermatozoide (Burkitt, 1993). Entre el estadio de espermatogonia y espermatozoide se pueden reconocer quistes en diferentes grados de desarrollo (espermaticitos de diferentes diámetros y sin flagelo), espermáticas (con el flagelo en formación) o espermatozoides con las cabezas orientadas hacia la periferia del quiste y los flagelos alineados hacia el centro (Figs. 10A y 10B).

El testículo está profusamente vascularizado (Fig. 10B, 5) y se observan conductos eferentes de diferentes diámetros (Figs. 10A, 3), con paredes glandulares de espesor variable (Figs. 10A, 4; 11B, 4; 11B', 4). En el interior de los conductos eferentes se encuentran los espermatóforos (quistes maduros). Los espermatóforos no están rodeados por una membrana visible y es probable que las cabezas de los espermatozoides estén embebidas en alguna matriz que los aglutina (Figs. 11A', 11B, 11 y 11B', 11).

La exposición de los alevines de *P. sphenops* al EE produjo alteraciones en el tejido ovárico que se acentuaron en proporción directa con la concentración del esteroide. La tendencia general se puede resumir en tres procesos de desarrollo principales: ovarios con distintos grados de alteración (todas las concentraciones), testículos que resistieron la transformación pero con diferentes grados de alteración (80 y 120 mg kg<sup>-1</sup>) y gónadas intersexuadas con un predominio de tejido espermático (200 y 400 mg kg<sup>-1</sup>).

En los peces expuestos a concentraciones bajas de EE (120 y 160 mg kg<sup>-1</sup>) (Figs. 12A y 12B) los ovocitos se desarrollaron como en el control (Fig. 8A), pero se observó una proliferación anormal de tejido somático, donde no hay ovocitos (Figs. 12A y 12B, p). Cuando la concentración de EE aumentó a 160 mg kg<sup>-1</sup> el cuadro histológico previamente mencionado se hizo más conspicuo; la cavidad ovárica que normalmente es un conducto estrecho recubierto por un epitelio (Fig. 8, e), se ensanchó formando grandes lagunas y tejido intersticial abundante (Fig. 12B, e y p respectivamente). Cuando la concentración del esteroide fue de 400 mg kg<sup>-1</sup>, además de los procesos degenerativos ya mencionados y que aumentan con respecto al control, se desarrollaron ovocitos atrésicos (Fig. 13A, q). En esta concentración también ocurrió un desarrollo precoz de los ovarios donde se encontraron ovocitos totalmente vitelados (Fig. 13B, r) en una gónada muy pequeña en comparación al control (Fig 8A).

Cuando la concentración de EE fue de 80 y 120 mg kg<sup>-1</sup> se observaron 14 y 15% de machos respectivamente, pero en sus testículos se generaron alteraciones importantes, como la proliferación anormal de tejido intersticial (Fig. 14 A y B) y la infiltración de células fagocíticas en los conductos eferentes, donde se observó la reabsorción de espermatozoides (Figs. 14A, 12 y 14B, 12).

El suministro de EE en concentraciones superiores a 160 mg kg<sup>-1</sup> resultó en la inducción parcial del sexo. Las gónadas de estos organismos principalmente se desarrollaron como testículos (Fig. 15A y B, 13). Entre los quistes, en diferentes estadios de desarrollo se encontraron ovocitos en menor cantidad (Fig. 15A, b) con un núcleo central grande y uno o varios nucléolos (Fig. 15B, c, d). Los organismos intersexuados sólo se encontraron cuando la concentración fue de 200 y 400 mg kg<sup>-1</sup>.

En los peces que fueron expuestos a la MT no se encontró un proceso degenerativo de las gónadas que estuviera directamente correlacionado con la concentración del andrógeno, como se observó en los peces expuestos al EE. En todos los tratamientos (80 a 800 mg kg<sup>-1</sup>) se desarrollaron machos y organismos intersexuados, pero no se encontró ninguna hembra.

La característica más sobresaliente en la gónada de estos machos fue la maduración precoz; presentaron una gran cantidad de conductos eferentes llenos de espermátóforos con espermatozoides maduros (Figs. 16A y 16B). Cualitativamente, la proporción entre los tejidos germinal y somático (G/S) cambiaron con respecto al control ( $G/S_{\text{control}} > G/S_{\text{MT}}$ ) debido a que los quistes en desarrollo (con espermátocitos, espermátidas y espermatozoides) fueron menos abundantes (Fig. 10A). Cuando la concentración de la MT aumentó a 800 mg kg<sup>-1</sup>, se desarrollaron grandes vacuolas (Fig. 17A y B, 14). En ninguno de los testículos analizados se encontró infiltración de fagocitos.

En los organismos con gónadas intersexuadas se reconocieron dos áreas correspondientes a cada sexo, el patrón más común consistió en el predominio del tejido espermático (Fig. 18A). En un ejemplar expuesto a 80 mg kg<sup>-1</sup> de MT, se desarrollaron de forma simultánea ovocitos vitelados y espermátóforos maduros, pero en este caso el área con características de ovario fue dominante (Figs. 18A y 18B). Cuando la concentración de MT fue más alta (800 mg kg<sup>-1</sup>), los ovocitos del área femenina de la gónada no maduraron y el número y diámetro de estas células fue muy pequeño con vitelogénesis reducida (Fig. 19A y B, b); sin embargo, los ovocitos se caracterizaron por tener un núcleo grande y varios nucléolos (Fig. 19B, d). Comparativamente un ovocito maduro tiene un citoplasma denso (Fig. 13B, r) y el núcleo no es visible. En esta gónada no se observó ningún proceso de reabsorción en el que participaran fagocitos.



Figura 8. A. Ovario de *Poecilia sphenops* (control)(50X). A'. Detalle del conducto ovárico (50X). B. Detalle de una sección del ovario (control)(200X). a, epitelio ovárico exterior; b, ovocitos en diferentes estadios de desarrollo; c, núcleos; d, nucléolos; e, cavidad ovárica; f, conducto ovárico; g, gotas de aceite; h, vaso sanguíneo; i, epitelio folicular.



Figura 9. A y A'. Características de la membrana primaria de un ovocito de *Poecilia sphenops* (control)(200X). B. Detalle de la membrana primaria del ovocito (control)(500X). b, ovocito; c, núcleo; d, nucléolos; g, gotas de aceite; h, vaso sanguíneo; i, epitelio folicular; j, proyecciones digitiformes de la membrana del ovocito; k, zona radiata; l, células de la granulosa; m, células de la teca.

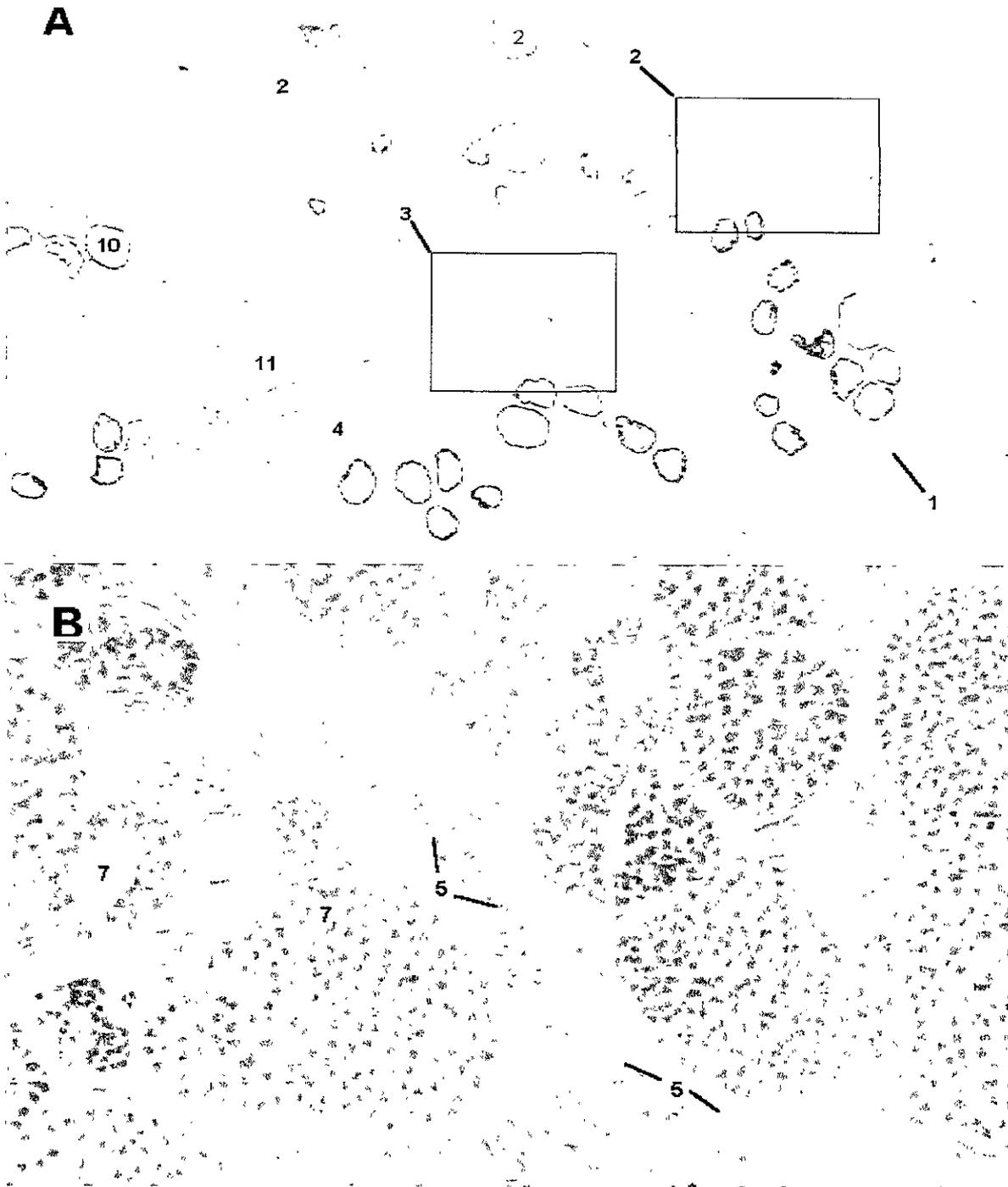


Figura 10. A. Testículo de *Poecilia sphenops* (control)(50X). B. Detalle de una sección del testículo (control)(200X). 1; túnica propia; 2, quistes en diferentes estadios de desarrollo; 3, conductos eferentes; 4, canal eferente; 5, vaso sanguíneo; 7, espermatozoides; 10, quiste maduro; 11, espermatozoides.

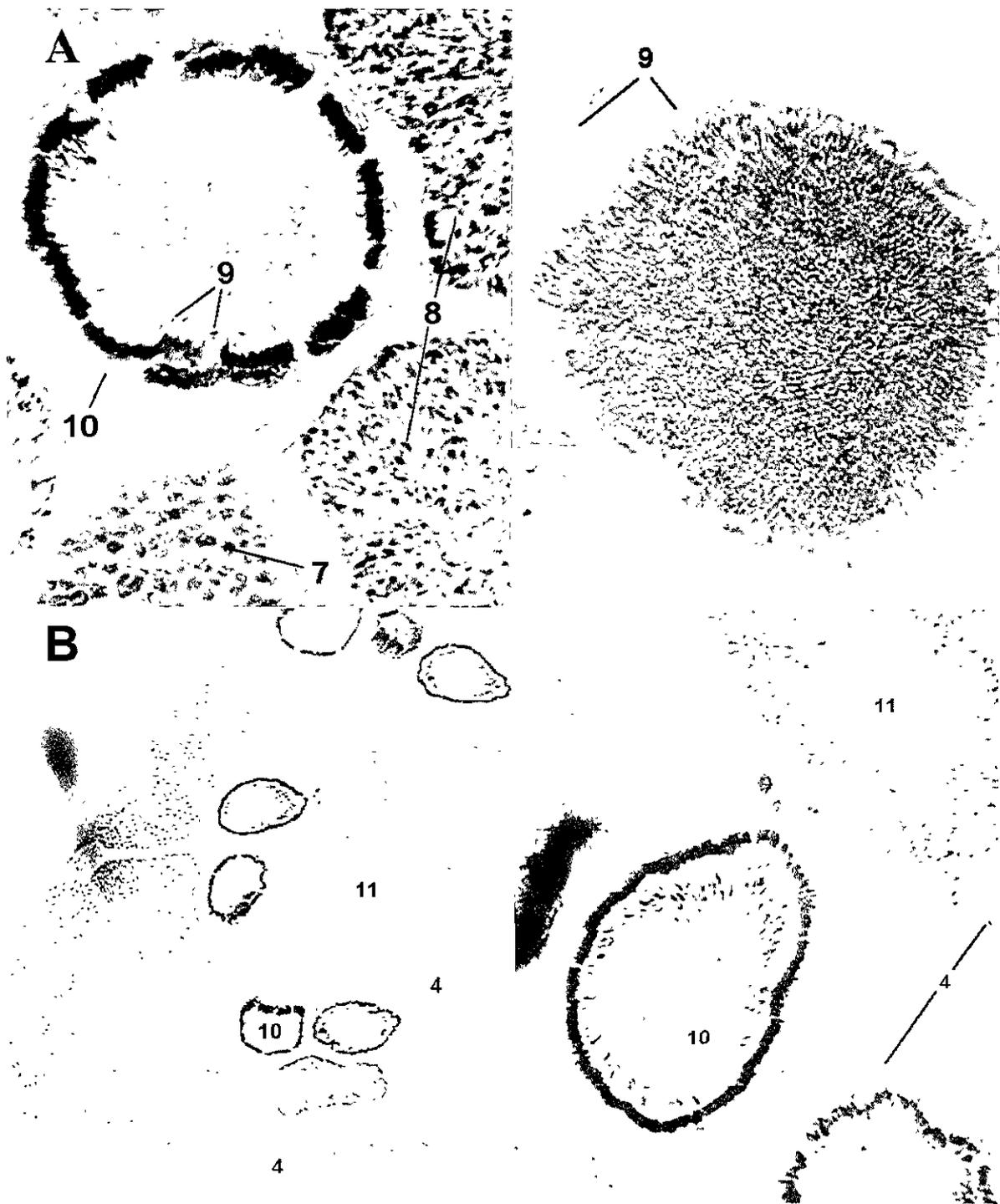


Figura 11. A. Quistes de *Poecilia sphenops* en diferentes estadios de desarrollo (control)(200X). A'. Espermátforo maduro extraído por presión abdominal (200X). B. quiste ingresando al canal eferente (control)(50X). B'. Detalle de B (200X). 4, epitelio glandular del canal eferente; 7, espermátocitos; 8, espermátidas; 9, espermátocitos; 10, quiste maduro; 11, espermátforo en conducto eferente.

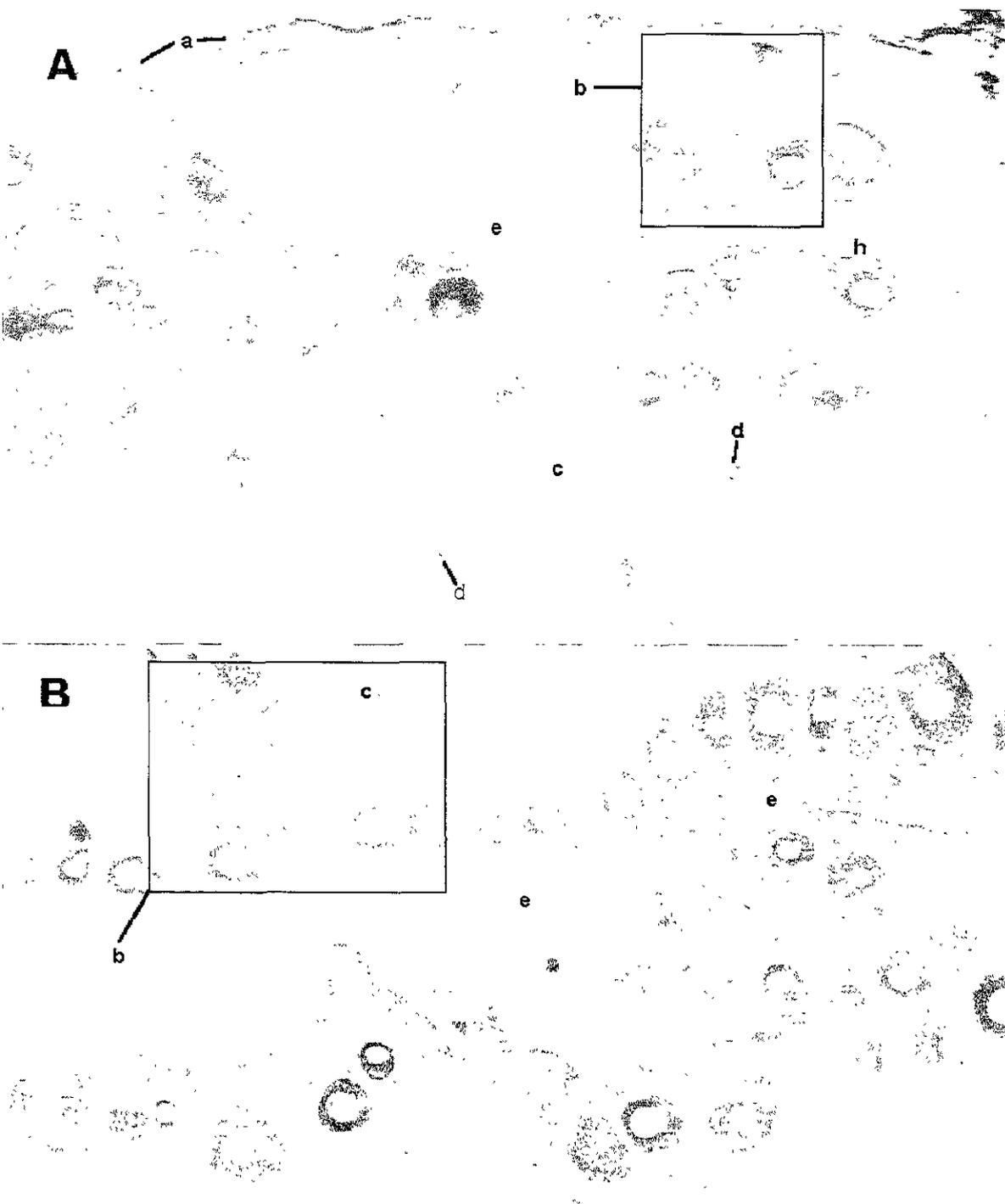


Figura 12. A. Ovario de *Poecilia sphenops* expuesta al efecto de  $17 \alpha$  etinilestradiol ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$ )(50X). B. Ovario de *Poecilia sphenops* con la cavidad ovárica alterada ( $160 \text{ mg kg}^{-1}$ )(200X). a, epitelio ovárico exterior; b, ovocitos en diferentes estadios de desarrollo; c, núcleos; d, nucléolos; e, cavidad ovárica; h, vaso sanguíneo; p, tejido intersticial.

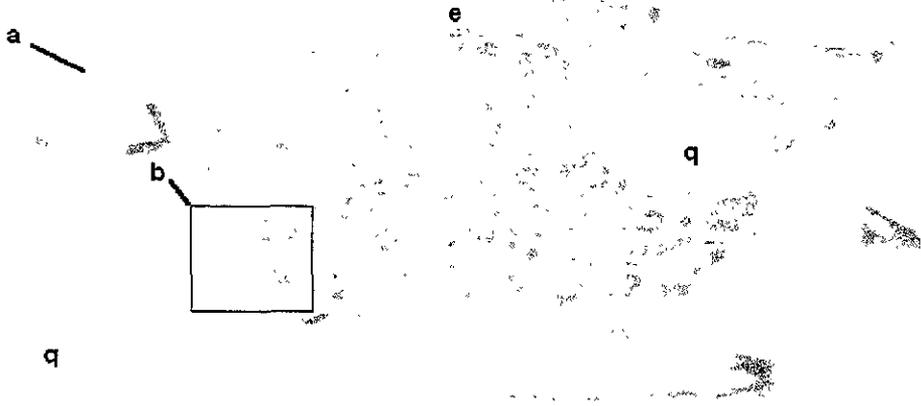
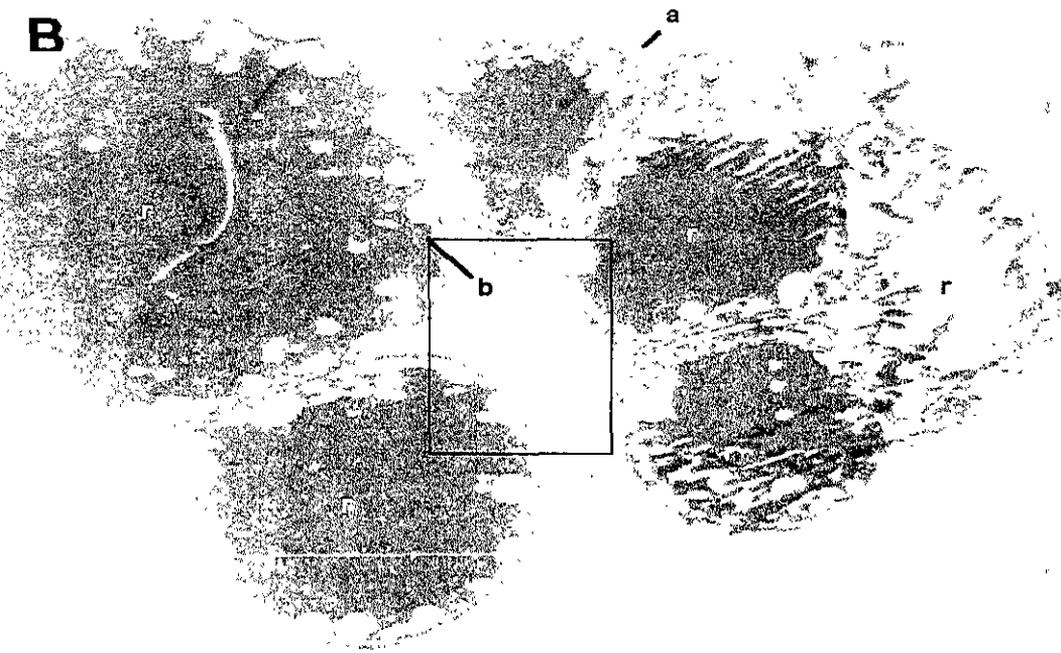
**A****B**

Figura 13. A. Ovario de *Poecilia sphenops* expuesta al efecto de  $17\alpha$  etinilestradiol ( $400\text{ mg kg}^{-1}$ ) con ovocitos atrésicos (20X). B. Ovario precoz ( $400\text{ mg kg}^{-1}$  de EE)(50X). a, epitelio ovárico; b, ovocitos en diferentes estadios de desarrollo; e, cavidad ovárica; q, ovocitos atrésicos; r, ovocitos vitelados.

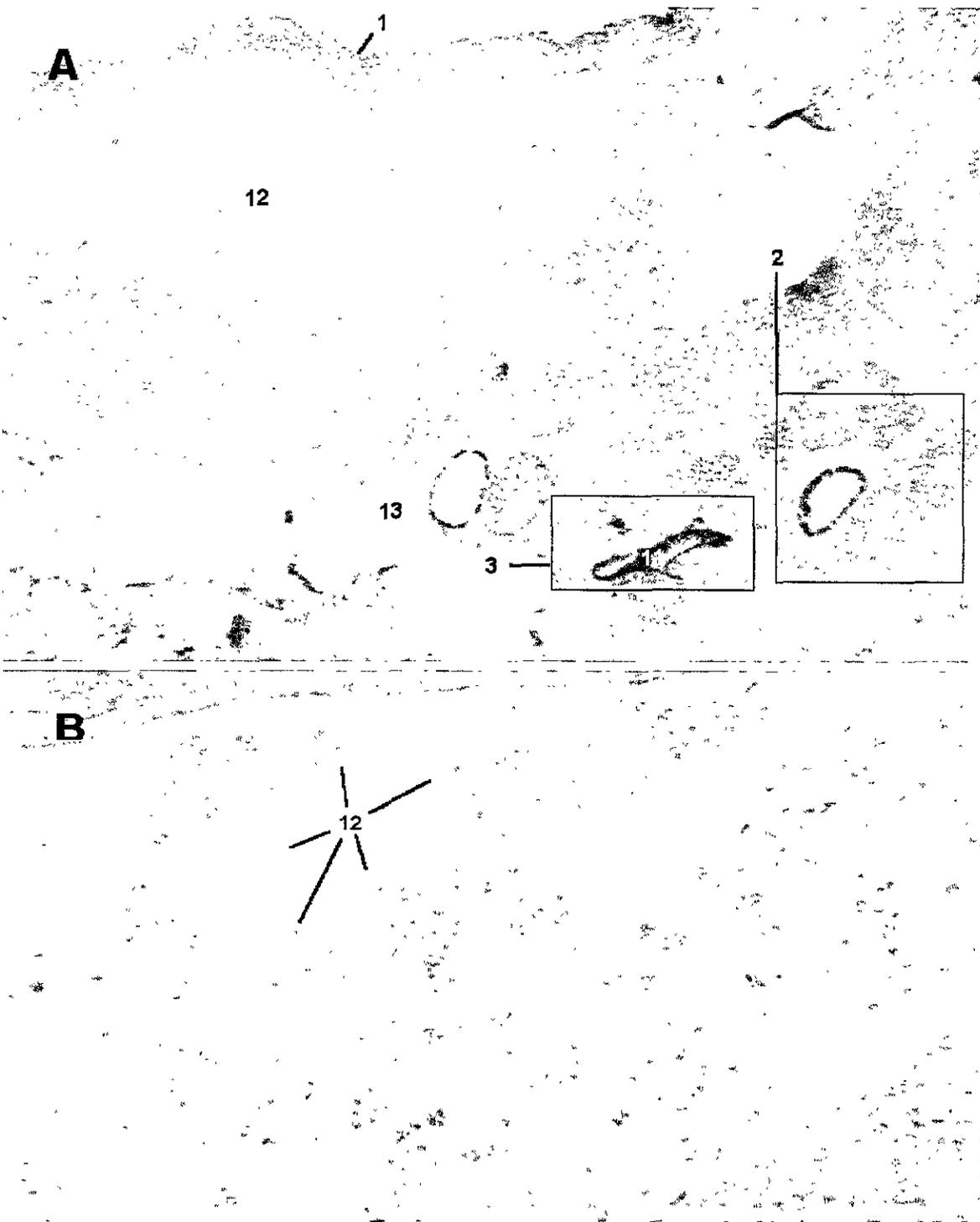


Figura 14. A. Testículo de *Poecilia sphenops* expuesta al efecto de  $17 \alpha$  etinilestradiol ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$ )(50X). B. Reabsorción de espermatozoides ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$ )(200X). 1, túnica propia; 2, quistes en diferentes estadios de desarrollo; 3, conducto eferente; 4, tejido intersticial; 11, espermátóforo; 12, fagocitos reabsorbiendo espermatozoides; 13, tejido intersticial.



Figura 15. A. Gónada intersexuada de *Poecilia sphenops*, efecto del  $17 \alpha$  etinilestradiol ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ )(50X). B. Detalle de la gónada intersexuada (200X). b, ovocitos en diferentes estadios de desarrollo; c, núcleo; d, nucléolo; 2, quistes en diferentes estadios de desarrollo; 3, conducto eferente; 7, espermatocitos; 8, espermátidas; 10, quiste maduro; 13, tejido intersticial.

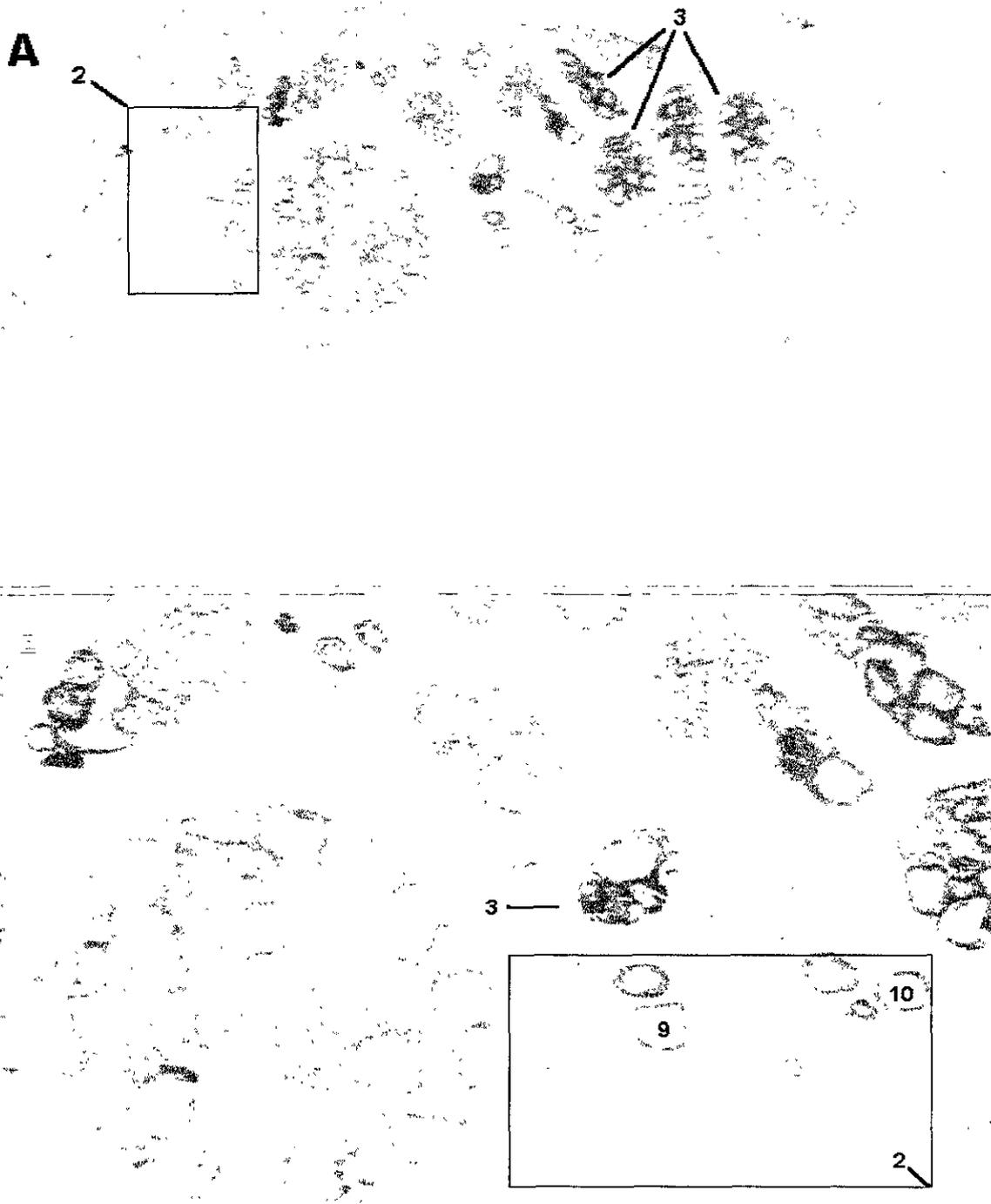


Figura 16. A. Testículo precoz de *Poecilia sphenops*, efecto de la  $17 \alpha$  metilttestosterona ( $80 \text{ mg kg}^{-1}$ )(12.5X). B. Detalle del testículo precoz ( $80 \text{ mg kg}^{-1}$ )(50X). 2, quistes en diferentes estadios de desarrollo; 3, conductos eferentes; 7, espermátocitos; 8, espermátidas; 9, quiste con espermatozoides; 10, quiste maduro; 11, espermátóforo; 15, hepatopáncreas.

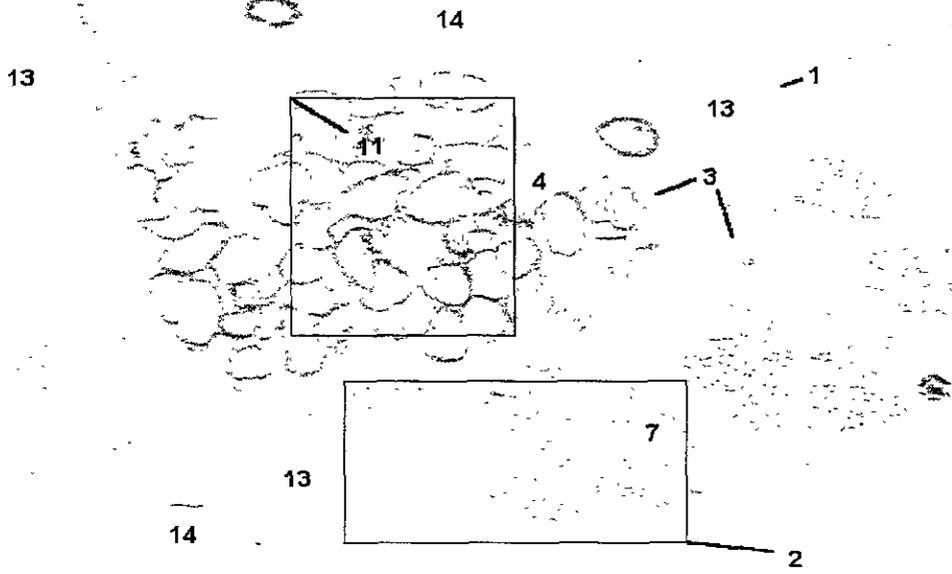
**A****13****5**

Figura 17. A. Testículo precoz de *Poecilia sphenops*, efecto de la  $17\alpha$  metiltestosterona ( $800\text{ mg kg}^{-1}$ )(50X). B. Testículo atrofiado ( $800\text{ mg kg}^{-1}$ ) (10 x 5). 1, túnica propia; 2, quistes en diferentes estadios de desarrollo; 3, conductos eferentes; 5, vaso sanguíneo; 7, espermatocitos; 11, espermátóforos; 13, tejido intersticial; 14, lagunas.

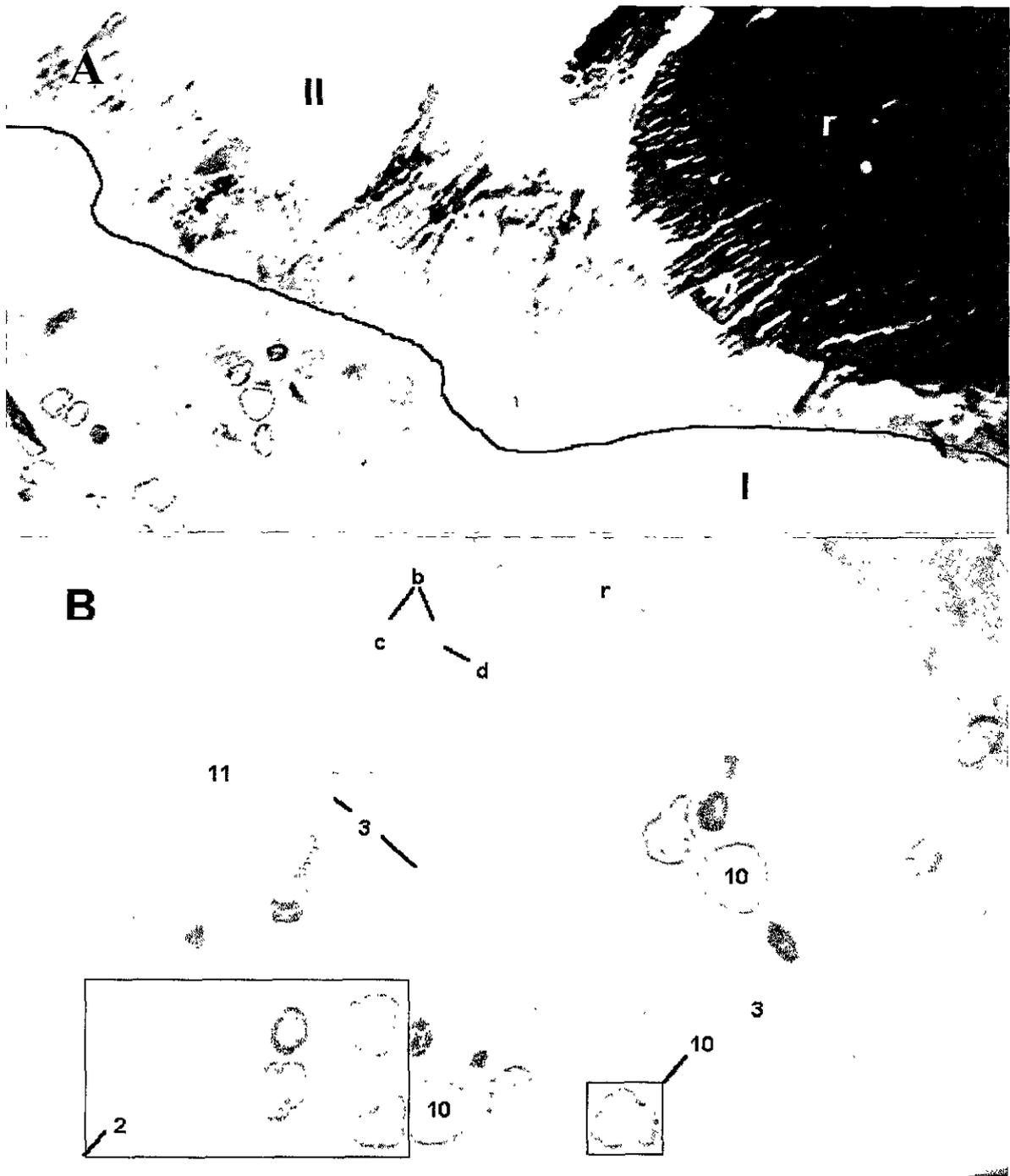


Figura 18. A. Gónada intersexuada de *Poecilia sphenops*, efecto de la  $17 \alpha$  metilttestosterona, la línea continua separa los tejidos masculino (I) y femenino (II) ( $80 \text{ mg kg}^{-1}$ )(12.5X). B. Detalle de la gónada intersexuada (50X); b, ovocitos en diferentes estadios de desarrollo; c, núcleo; d, nucléolo; r, ovocitos vitelados; 2, quistes en diferentes estadios de desarrollo; 3, conductos eferentes; 7, espermatoцитos; 10, quiste maduro,

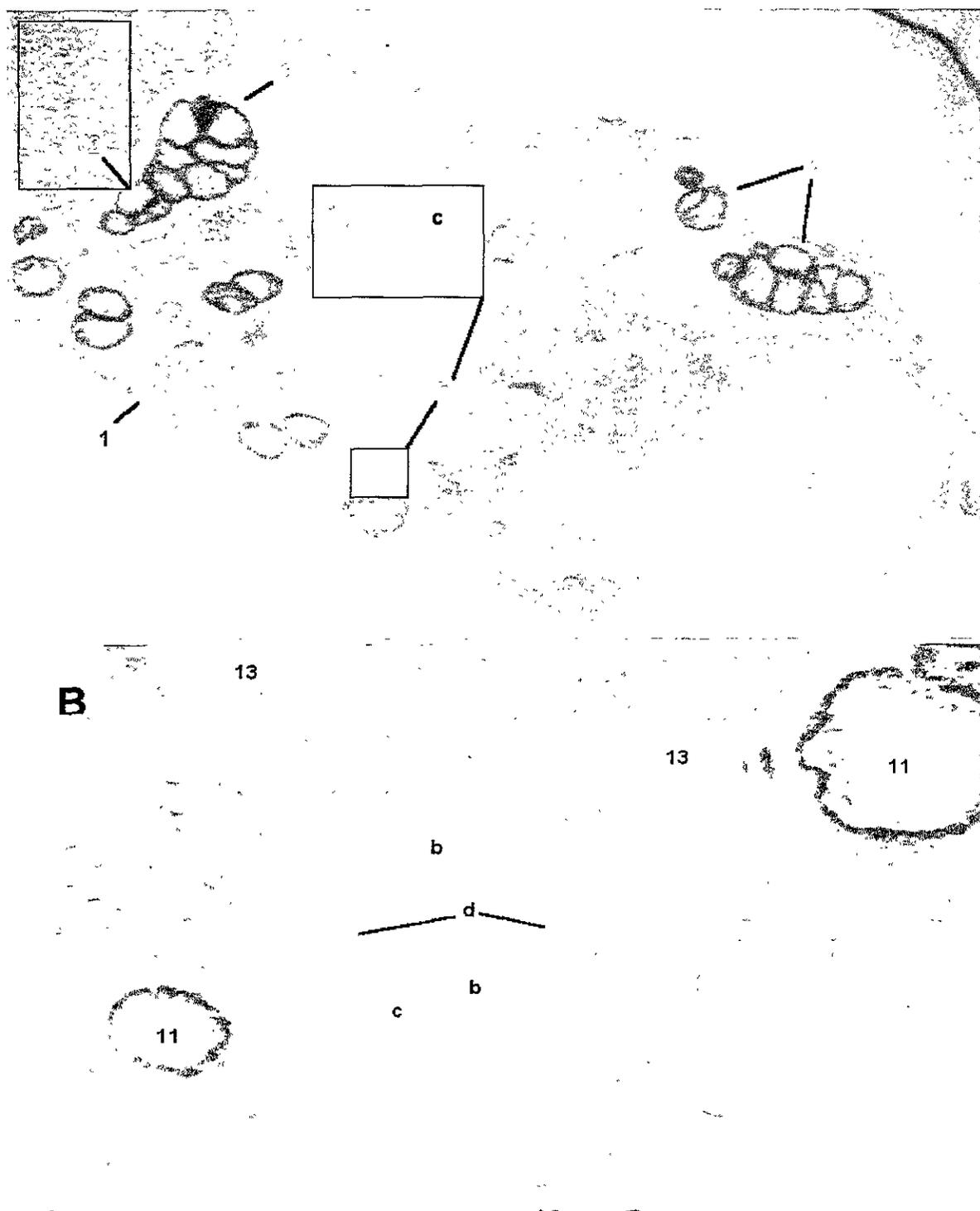


Figura 19. A Gónada intersexuada de *Poecilia sphenops*, efecto de la  $17\alpha$  metiltestosterona ( $800\text{ mg kg}^{-1}$ )(50X). B, detalle de la gónada intersexuada (200X). b, ovocitos en diferentes estadios de desarrollo; c, núcleo; d, nucléolos; 1, epitelio testicular; 2, quistes en diferentes estadios de desarrollo; 3, conductos eferentes; 11, espermátóforos; 13, tejido intersticial; 14, lagunas.

### III.2.2 Efectos secundarios del 17 $\alpha$ etinilestradiol y la 17 $\alpha$ metiltestosterona en la morfología externa de *P. sphenops*

La exposición de *P. sphenops* al EE y a la MT indujo alteraciones morfológicas. La longitud total de los organismos expuestos a los diferentes tratamientos con la MT se redujo de manera significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación con el control y con los organismos que recibieron EE (Fig. 20). En el grupo de organismos tratados con MT, el mayor crecimiento en longitud total (31 mm) ocurrió con la concentración hormonal de 400 mg kg<sup>-1</sup>; sin embargo, las diferencias observadas no fueron significativas con respecto a las otras concentraciones.

En referencia al EE la mayor longitud (40 mm) se observó en los organismos expuestos a 120 mg kg<sup>-1</sup> y fue similar al control ( $P > 0.05$ ). En concentraciones mayores, el crecimiento disminuyó de manera significativa en un 5% de los peces dosificados con 400 mg kg<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ). En la concentración de 800 mg kg<sup>-1</sup> de EE murió el 100% de los organismos.

Las aletas y las proporciones anatómicas de los peces dosificados con MT resultaron con alteraciones morfológicas importantes (Tabla 8). En la región cefálica (Fig. 21, a) se observaron alteraciones de la boca con la mandíbula inferior exageradamente prognatada (Fig. 21, b). La cabeza que normalmente tiene la forma aguzada (Fig. 21, a) se tornó abultada y con una región frontal muy prominente (Fig. 21, b). Los tubérculos cefálicos, característicos de los machos, se desarrollaron de manera conspicua en el 100 % de los organismos (Fig. 21, c). Visto en posición lateral se observó el cuerpo arqueado desde la cabeza hasta la aleta caudal, con la región dorsal muy convexa. La aleta dorsal se truncó; los radios se notaron acortados y retorcidos (Fig. 21, e). La aleta anal (Fig. 21, f) se transformó en grado variable, desde una especie de gonopodio mal diferenciado hasta un muñón (Fig. 21, g).

El análisis "cluster" de las 14 medidas corporales (Tabla 9) reveló que aquellos organismos tratados con MT difieren de los expuestos a EE y del control con un

valor de disimilitud de 8.28. En los peces tratados con EE la disimilitud se incrementó al aumentar la concentración de la hormona; el tratamiento con 120 mg kg<sup>-1</sup> fue similar al control; los tratamientos de 160 y 200 mg kg<sup>-1</sup> fueron los más disímiles. En el grupo de organismos tratados con 80 mg kg<sup>-1</sup> de MT no se observaron alteraciones morfológicas; sin embargo, su fenotipo es característico de un macho de esta especie, por lo que la distancia que lo separa del resto del subconjunto EE-control es de 4.43, pero la distancia con el grupo de MT aproximadamente es el doble (8.28). La formación de dos grandes grupos está asociada con el grado de deformación corporal observado en los organismos tratados con MT (120, 160, 200, 400 y 800 mg kg<sup>-1</sup>) que difiere de la anatomía de la especie de manera tal que la similitud entre los tratamientos con EE y el control es 2.68 (Fig. 22).

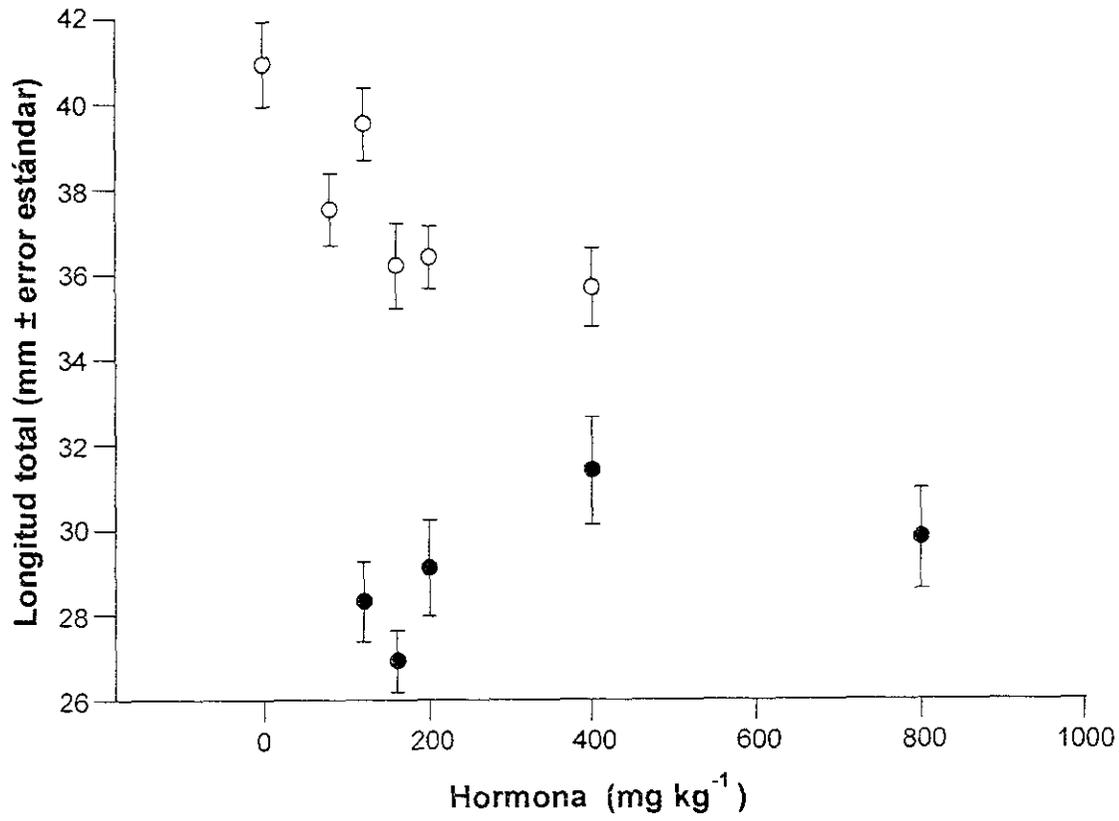


Figura 20. Longitud total promedio de *Poecilia sphenops* expuesta a diferentes concentraciones de 17  $\alpha$  etinilestradiol (○) y 17  $\alpha$  metiltestosterona (●) durante 40 días. Las líneas verticales indican el error estándar.

Tabla 8. Caracteres morfométricos de *Poecilia sphenops*, expuesta a diferentes concentraciones de 17  $\alpha$  metiltestosterona (MT) y 17  $\alpha$  etinilestradiol (EE) ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ). AM= altura máxima; Am= altura mínima; BAD= base de la aleta dorsal; DIO= distancia interorbital; DO= diámetro ocular; DPD= distancia predorsal; DPO= distancia preorbital; LAPT= longitud de las aletas pectorales; LAPV= longitud de las aletas pélvicas; LC= longitud cefálica; LP= longitud patrón; LAC= longitud de la aleta caudal; LT= longitud total; MA= ancho máximo.

	17 $\alpha$ metiltestosterona (mg kg <sup>-1</sup> )						
	(0)	(80)	(120)	(160)	(200)	(400)	(800)
AM	9.7 $\pm$ 0.23	10.4 $\pm$ 0.62	5.8 $\pm$ 0.19	5.5 $\pm$ 0.14	6.2 $\pm$ 0.26	6.6 $\pm$ 0.33	6.6 $\pm$ 0.31
Am	5.3 $\pm$ 0.14	6.6 $\pm$ 0.27	3.9 $\pm$ 0.19	3.5 $\pm$ 0.13	3.8 $\pm$ 0.17	4.1 $\pm$ 0.17	3.9 $\pm$ 0.15
BAD	4.5 $\pm$ 0.11	6.0 $\pm$ 0.80	3.2 $\pm$ 0.05	3.0 $\pm$ 0.08	3.2 $\pm$ 0.13	3.4 $\pm$ 0.15	3.0 $\pm$ 0.11
DIO	5.0 $\pm$ 0.12	4.3 $\pm$ 0.21	2.4 $\pm$ 0.12	2.4 $\pm$ 0.08	2.5 $\pm$ 0.09	2.8 $\pm$ 0.15	2.6 $\pm$ 0.09
DO	2.6 $\pm$ 0.04	2.6 $\pm$ 0.13	1.7 $\pm$ 0.04	1.7 $\pm$ 0.04	1.8 $\pm$ 0.05	1.9 $\pm$ 0.07	2.2 $\pm$ 0.30
DPD	19.7 $\pm$ 0.56	19.2 $\pm$ 1.12	12.2 $\pm$ 0.38	11.5 $\pm$ 0.33	12.6 $\pm$ 0.48	13.6 $\pm$ 0.60	13.8 $\pm$ 0.86
DPO	2.7 $\pm$ 0.07	2.9 $\pm$ 0.11	1.8 $\pm$ 0.06	1.6 $\pm$ 0.04	1.8 $\pm$ 0.07	1.9 $\pm$ 0.10	1.8 $\pm$ 0.05
LAPT	6.1 $\pm$ 0.15	6.6 $\pm$ 0.21	4.5 $\pm$ 0.10	4.2 $\pm$ 0.10	4.5 $\pm$ 0.14	4.7 $\pm$ 0.13	4.3 $\pm$ 0.31
LAPV	4.2 $\pm$ 0.19	5.6 $\pm$ 0.51	2.7 $\pm$ 0.06	2.6 $\pm$ 0.08	2.7 $\pm$ 0.12	2.5 $\pm$ 0.22	2.8 $\pm$ 0.10
LC	8.8 $\pm$ 0.18	8.5 $\pm$ 0.32	5.4 $\pm$ 0.15	5.1 $\pm$ 0.15	5.5 $\pm$ 0.15	5.9 $\pm$ 0.21	5.3 $\pm$ 0.15
LP	33.0 $\pm$ 0.73	34.1 $\pm$ 1.81	22.4 $\pm$ 0.79	20.7 $\pm$ 0.59	22.9 $\pm$ 0.85	24.3 $\pm$ 1.06	22.6 $\pm$ 1.11
LAC	8.6 $\pm$ 0.19	9.3 $\pm$ 0.96	6.5 $\pm$ 0.12	6.4 $\pm$ 0.15	6.8 $\pm$ 0.20	7.1 $\pm$ 0.21	6.6 $\pm$ 0.32
LT	40.9 $\pm$ 0.99	44.2 $\pm$ 2.06	28.3 $\pm$ 0.95	26.9 $\pm$ 0.75	29.1 $\pm$ 1.15	31.4 $\pm$ 1.26	29.8 $\pm$ 1.19
MA	6.7 $\pm$ 0.20	6.7 $\pm$ 0.78	4.2 $\pm$ 0.14	4.1 $\pm$ 0.12	4.6 $\pm$ 0.21	5.0 $\pm$ 0.25	5.1 $\pm$ 0.24

Tabla 8. (Continuación)

56

	17 $\alpha$ etinilestradiol (mg kg <sup>-1</sup> )					
	(0)	(80)	(120)	(160)	(200)	(400)
AM	9.7 $\pm$ 0.23	8.8 $\pm$ 0.25	9.4 $\pm$ 0.21	8.5 $\pm$ 0.33	8.6 $\pm$ 0.18	9.2 $\pm$ 0.27
Am	5.3 $\pm$ 0.14	4.7 $\pm$ 0.12	4.9 $\pm$ 0.11	4.4 $\pm$ 0.17	4.5 $\pm$ 0.09	4.5 $\pm$ 0.13
BAD	4.5 $\pm$ 0.11	4.0 $\pm$ 0.10	4.3 $\pm$ 0.11	3.7 $\pm$ 0.13	3.9 $\pm$ 0.09	3.6 $\pm$ 0.09
DIO	5.0 $\pm$ 0.12	4.6 $\pm$ 0.09	4.8 $\pm$ 0.10	4.4 $\pm$ 0.12	4.4 $\pm$ 0.08	4.2 $\pm$ 0.09
DO	2.6 $\pm$ 0.04	2.4 $\pm$ 0.04	2.4 $\pm$ 0.04	2.3 $\pm$ 0.05	2.3 $\pm$ 0.03	2.3 $\pm$ 0.03
DPD	19.7 $\pm$ 0.56	17.8 $\pm$ 0.41	18.9 $\pm$ 0.41	17.2 $\pm$ 0.75	17.6 $\pm$ 0.36	17.5 $\pm$ 0.49
DPO	2.7 $\pm$ 0.07	2.3 $\pm$ 0.07	2.5 $\pm$ 0.08	2.2 $\pm$ 0.06	2.3 $\pm$ 0.06	2.4 $\pm$ 0.07
LAPT	6.1 $\pm$ 0.15	5.4 $\pm$ 0.11	5.7 $\pm$ 0.11	5.3 $\pm$ 0.14	5.2 $\pm$ 0.12	4.9 $\pm$ 0.10
LAPV	4.2 $\pm$ 0.19	3.5 $\pm$ 0.11	3.7 $\pm$ 0.11	3.4 $\pm$ 0.09	3.4 $\pm$ 0.12	3.1 $\pm$ 0.05
LC	8.8 $\pm$ 0.18	7.9 $\pm$ 0.15	8.2 $\pm$ 0.18	7.7 $\pm$ 0.16	7.7 $\pm$ 0.15	7.6 $\pm$ 0.15
LP	33.0 $\pm$ 0.73	30.5 $\pm$ 0.94	31.6 $\pm$ 0.71	28.9 $\pm$ 0.90	29.1 $\pm$ 0.59	29.0 $\pm$ 0.85
LAC	8.6 $\pm$ 0.19	7.8 $\pm$ 0.17	8.1 $\pm$ 0.11	7.6 $\pm$ 0.16	7.5 $\pm$ 0.21	7.2 $\pm$ 0.14
LT	40.9 $\pm$ 0.99	37.6 $\pm$ 0.85	39.6 $\pm$ 0.85	36.2 $\pm$ 1.01	36.4 $\pm$ 0.74	35.7 $\pm$ 0.92
MA	6.7 $\pm$ 0.20	6.2 $\pm$ 0.17	6.6 $\pm$ 0.16	5.8 $\pm$ 0.25	6.1 $\pm$ 0.15	6.8 $\pm$ 0.23

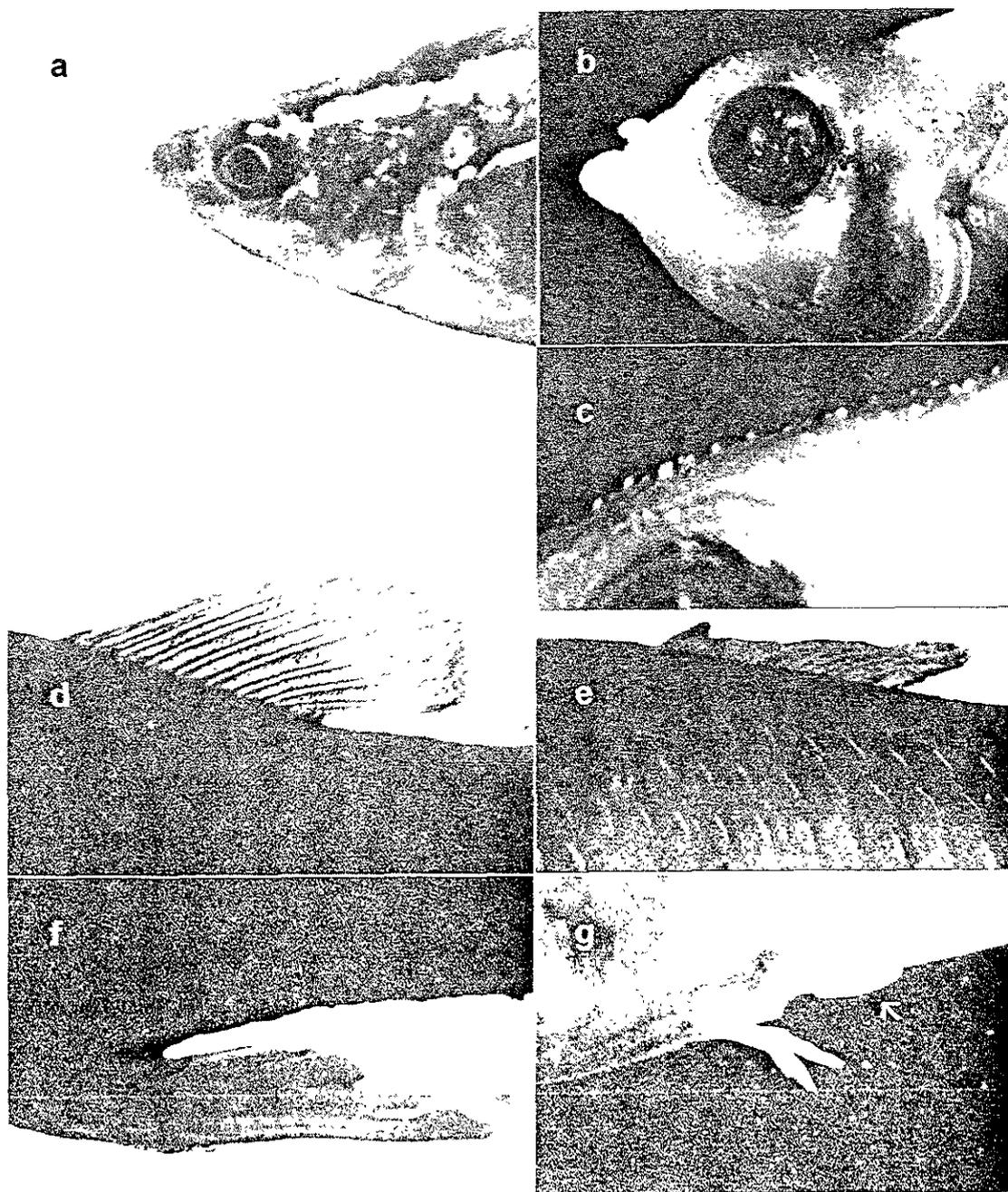


Figura 21. Diagrama de las alteraciones morfológicas causadas por el efecto de la  $17\alpha$  metilttestosterona (MT) en *Poecilia sphenops*. a, región cefálica normal; b, boca prognatada; c, tubérculos cefálicos; d, aleta dorsal normal; e, aleta dorsal anormal; f, aleta anal normal (gonopodio); g, aleta anal anormal ( $\kappa$ ).

Tabla 9. Matriz de las distancias euclidianas entre los tratamientos con las hormonas 17  $\alpha$  metiltestosterona (MT), 17  $\alpha$  etinilestradiol (EE) y el control (Ctrl), calculadas de las medidas del cuerpo de *Poecilia sphenops*.

		Ctrl		MT mg kg <sup>-1</sup>					EE mg kg <sup>-1</sup>				
		0	80	120	160	200	400	800	80	120	160	200	400
Ctrl	0	0.0											
MT	80	4.4	0.0										
	120	19.5	22.8	0.0									
	160	21.8	25.1	2.4	0.0								
	200	18.4	21.6	1.3	3.5	0.0							
	400	15.5	18.8	4.2	6.4	3.0	0.0						
	800	17.6	20.9	2.6	4.5	1.7	2.5	0.0					
EE	80	5.1	8.9	14.5	16.9	13.4	10.5	12.6	0.0				
	120	2.6	6.5	17.2	19.5	16.0	13.1	15.2	2.7	0.0			
	160	7.3	11.0	12.3	14.6	11.1	8.3	10.3	2.3	4.9	0.0		
	200	6.9	10.6	12.8	15.1	11.6	8.8	10.8	1.9	4.5	0.7	0.0	
	400	7.6	11.3	12.4	14.7	11.3	8.4	10.4	2.7	5.1	1.6	1.3	0.0

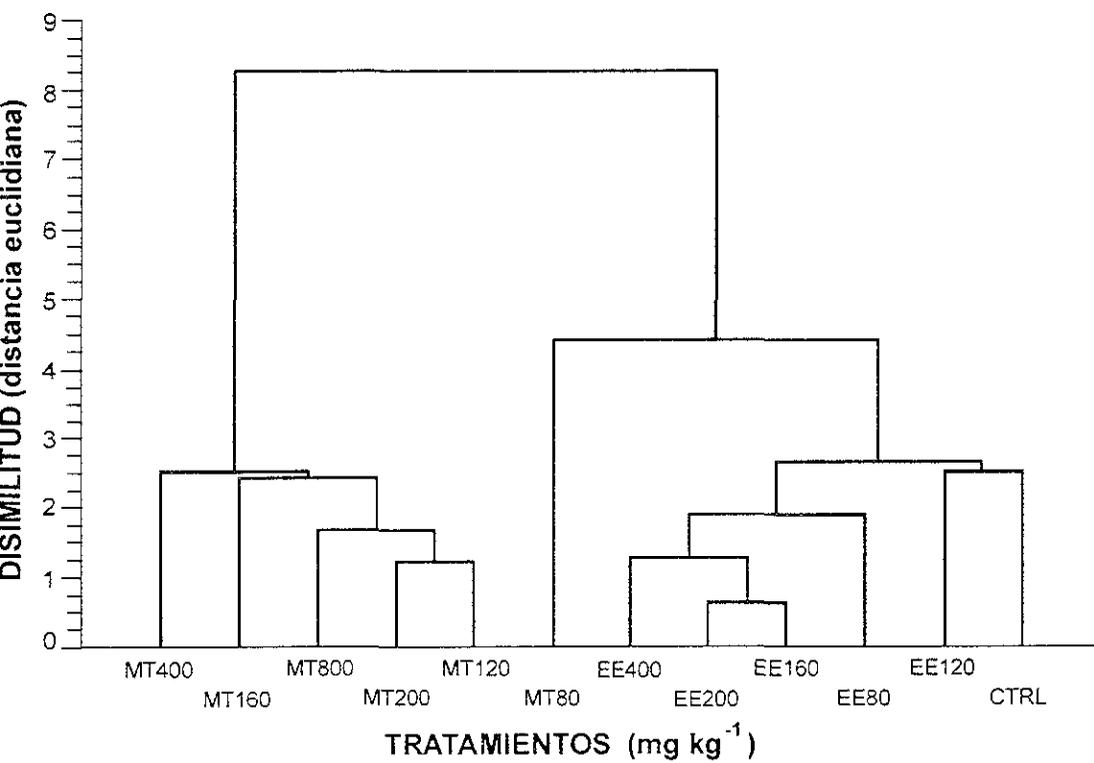


Figura 22. Diagrama de árbol de las medidas corporales de *Poecilia sphenops* expuesta a diferentes concentraciones de 17  $\alpha$  etinilestradiol (EE) y 17  $\alpha$  metiltestosterona (MT) durante 40 días.

#### IV. DISCUSIÓN

Los mecanismos genéticos de determinación del sexo están presentes en los peces incluyendo aquellos con hermafroditismo ocasional; si bien, algunas especies y taxa completos se encuentran en diferentes niveles en la secuencia evolutiva de este proceso. La determinación poligénica del sexo observada en algunos miembros de la familia Poeciliidae pertenece al tipo más primitivo (Kirpichnikov, 1981).

Se ha demostrado que la proporción sexual en *Poeciliopsis lucida* es influida por la temperatura; el porcentaje de machos se correlacionó en forma positiva con este factor (Sullivan y Schultz, 1986). Los autores mencionan que esta respuesta depende del linaje de los reproductores, uno de los cuales principalmente produce machos cuando el desarrollo ocurre a 30°C y el otro da como resultado proporciones 1:1 independientemente de la temperatura. Por otra parte, el pH influyó en las proporciones sexuales de diferentes especies de peces incluyendo al poecílido *Xiphophorus helleri* (Rubin, 1985); con valores bajos de pH (5-6) se obtuvo una proporción mayor de machos, mientras que a pH 7 la mayor proporción sexual fue de hembras. En contraste con lo observado por Sullivan y Schultz (1986) y Rubin (1985), en *P. sphenops* una combinación de alta temperatura (30°C) y un pH 6 y 7 indujeron las mayores proporciones de hembras y en la combinación de 22 y 26°C y pH 8 la proporción de machos se incrementó. Sin embargo, como lo mencionan Adkins-Regan (1987) y Schultz (1993), no existe una correlación única entre la temperatura y el sexo inducido, ya que en diferentes especies es posible observar que altas y bajas temperaturas pueden propiciar de manera indistinta el desarrollo de machos o hembras. Los autores refieren que la temperatura afecta la proporción sexual de otros vertebrados como los reptiles y la de los peces, cuando coincide con un periodo de sensibilidad que sucede durante una etapa crítica del desarrollo ontogénico cercana a la eclosión, aunque tampoco se conoce el mecanismo por el cual la temperatura altera el sexo.

Con respecto al pH, se ha observado que puede influir en la reproducción de los peces de diferentes formas, reduciendo la motilidad de los espermatozoides o afectando el sistema endocrino de las hembras durante el proceso de maduración; también puede inhibir la producción o la actividad de las hormonas (Rubin, 1985; Vizziano *et al.*, 1995). En este estudio, tanto los progenitores como su descendencia se expusieron al efecto de la temperatura y el pH durante los periodos de aclimatación, apareamiento, gestación y desarrollo (210 días aproximadamente), por lo que es posible que las alteraciones provocadas por los factores ambientales, ocurrieran en todos o en algunos procesos fisiológicos o mecanismos controladores de la proporción sexual.

Durante el tiempo que duró el experimento se registró una mortalidad importante a pH de 6.2 y 8.0 en todas las temperaturas estudiadas; al respecto, Farr (1981) afirma que la diferencia en la proporción sexual no es consecuencia de un proceso de mortalidad diferencial ocurrido durante el desarrollo ontogénico.

La mortalidad observada se podría atribuir a alteraciones en el balance iónico del pez. Se conoce que el pH ácido puede inhibir el transporte de los cationes  $H^+$  y  $NH_4^+$  y por lo tanto la entrada de  $Na^+$ . Bajo condiciones alcalinas, los niveles de amonio en el agua se incrementan, inhibiendo su excreción e incrementando el contenido total de amonio ( $NH_4^+ + NH_3$ ) en el organismo (Randall y Lin, 1993).

Algunos autores mencionan que el mecanismo de determinación sexual puede depender de un sistema variable de desarrollo homeostático que resulta del efecto combinado de dos factores: la ausencia, presencia o balance de los genes sexuales y el cambio durante el desarrollo de un mecanismo de naturaleza genética y/o ambiental para determinar el momento y la ocurrencia de los dos programas sexuales alternativos (Chan y Wai-Sum, 1981). El resultado de esto es una proporción sexual alejada de las predicciones del modelo heterogamético tradicional que implica el balance entre los sistemas de determinación ambiental del sexo (SDAS) y la determinación genética del sexo (SDGS) mencionados por

Shultz (1993). Por otra parte, se ha argumentado que tanto el SDGS como el SDAS permiten que *Menidia menidia* se adecúe mejor a un ambiente particular, que con una proporción sexual rígida 1:1 (Conover y Heins, 1987). Cabe señalar que muchas poblaciones de poecilidos son temporalmente variables, crecen y declinan de manera errática bajo la influencia de agentes reguladores bióticos y abióticos (Constantz, 1979; 1989; Meffe y Snelson, 1989).

La población oaxaqueña de *Poecilia sphenops*, objeto de este estudio, habita en una cuenca hidrográfica que tiene prolongadas estaciones de sequía y extensos periodos de lluvia (Fig. 23) con importantes avenidas de los ríos. La temporada de lluvias representa la transición entre dos estadios poblacionales, al final de la época de sequía (abril-mayo), es común observar una gran cantidad de organismos congregados en las zonas someras del cuerpo de agua (10 a 20 cm de profundidad); contrariamente, al final de la época de lluvias (septiembre-octubre), no fue posible capturar ni un solo ejemplar. El ambiente extremo ocasionado por la secuencia de estos periodos de sequía y lluvia probablemente han desarrollado en *P. sphenops* la capacidad reproductiva que le permite repoblar el hábitat en cada ciclo anual.

Al final de la época de lluvias y por efecto de la avenida de los ríos la temperatura disminuye (otoño-invierno) y el tamaño de la población también decrece notoriamente. Después de la temporada de lluvias, el número de machos se podría incrementar como una consecuencia del pH básico y la proporción sexual se acercaría a la unidad; en consecuencia, la población se recupera debido al aumento de la probabilidad de apareamiento. Después de la estación lluviosa, la temperatura ambiental de la región alcanza su máximo (Fig. 23) y el pH del agua decrece; en estas condiciones de alta temperatura y pH 6.0, se produce un gran número de hembras. La disminución en el valor del pH (6-4) asociado con la descomposición de la materia orgánica y la turbiedad del agua puede ser atribuido a la presencia de ácidos orgánicos los cuales contribuyen a la formación de ácido sulfúrico (Hutchinson, 1957).

De manera similar a la determinación ambiental del sexo, la determinación poligénica también pertenece a esta condición primitiva de determinación sexual, donde el balance de los genes masculinos y femeninos, que están localizados en diferentes cromosomas, determinan el sexo. En *Xiphophorus helleri*, *Limia vittata* y en *L. caudofasciata* de la familia Poeciliidae cada gene individualmente afecta el desarrollo gonadal en forma débil y por lo tanto una condición ambiental particular o una variación en el genotipo pueden conducir a cambios en la proporción sexual (Kirpichnikov, 1981).

La determinación sexual, mediada por cromosomas especializados, representa una condición más avanzada. Los cromosomas sexuales X y Y o W y Z son diferentes porque contienen uno o varios genes masculinos o femeninos, sin embargo, en muchos peces su tamaño y su forma son idénticos. Este modo de determinación sexual, es característico de los salmones, de los ciprinidos y de algunas especies de la familia Poeciliidae como *Poecilia reticulata* y *P. variatus* y también de *Oryzias latipes* de la familia Cyprinodontidae (Kirpichnikov, 1981). En *P. sphenops* la hembra es heterogamética; el sexo es determinado por los cromosomas sexuales maternos W o Z, los que después de la fertilización (cromosoma sexual paterno Z) dan como resultado una hembra (WZ) o un macho (ZZ) respectivamente (Rishi y Gaur, 1976).

En los peces la proporción sexual más comúnmente observada de un macho por cada hembra se deriva de la composición genotípica de los progenitores XX-XY o ZZ-WZ (Yamazaki 1983). La proporción sexual primaria (al momento de la fertilización) y secundaria (al momento del nacimiento) de diferentes especies de pecillos coincide con la proporción 1♀:1♂ (Snelson, 1989). Sin embargo, las poblaciones de los peces adultos están dominadas por hembras; este sesgo se atribuye a causas secundarias que no están relacionadas con el proceso de determinación del sexo. Farr (1981) señala que la composición primaria de los sexos no ha sido estudiada, que la proporción sexual secundaria ha sido evaluada

como 1:1 y ésta no debe ser muy diferente de la primaria. Este autor también se refiere a que no es común observar grandes mortalidades durante el desarrollo embrionario, lo cual podría alterar dicha proporción. En los organismos utilizados como controles en el presente estudio, no ocurrió mortalidad después del nacimiento y la proporción observada fue de tres hembras por un macho. Recientemente, Marañón *et al.* (1999) observaron que la proporción sexual en *Xiphophorus helleri* después de 120 días fue aproximadamente de 20 hembras por cada macho y la mortalidad fue del 20%. Los autores consideran esta mortalidad como la causa del sesgo. En este caso la proporción sexual sería de cuatro hembras por cada macho, muy similar a la observada en *P. sphenops*, en el presente trabajo.

En un estudio de la dinámica poblacional de *Lebistes reticulatus* (sin. *Poecilia reticulata*) en condiciones de laboratorio, se ha encontrado que la proporción sexual primaria y secundaria (evaluada cuando el crecimiento de la población alcanzó el equilibrio) fue de dos hembras y un macho (Breder y Coates, 1932). También se sabe que cuando una población de *L. reticulatus* está sujeta a un proceso con diferentes intensidades de explotación (sin discriminación entre los sexos), la proporción de machos aumenta y comparativamente supera a los controles cuya proporción fue de 1♀:1♂ y 2♀:1♂. Es posible que las diferencias genéticas pueden ser la causa de las diferentes proporciones sexuales observadas en los pecílidos (Silliman y Gutsell, 1958).

La estimación preliminar de la proporción sexual de *P. sphenops* expuesta a los esteroides EE y MT con base en los caracteres sexuales secundarios (el gonopodio, la conducta sexual y la morfología característica de las hembras) condujo a una sobrestimación del número total de hembras y machos inducidos por cada hormona.

El subsecuente análisis histológico de las gónadas de *P. sphenops* reveló que en los organismos expuestos a 200 y 400 mg kg<sup>-1</sup> de EE se desarrollaron gónadas

intersexuadas (7%). Se ha mencionado que la falta de efectividad de los esteroides para inducir el sexo puede estar relacionada con la dosis óptima; en este sentido se han suministrado esteroides en la dieta a diferentes especies del género *Oreochromis* colocados en estanques a diferentes densidades; en aquellos tratamientos donde la densidad fue alta (2600 alevines  $m^{-2}$ ) se encontraron organismos intersexuados (Rosenstein y Hulata, 1993). El desarrollo de estos organismos anormales se atribuyó a un tratamiento hormonal subóptimo, que pudo resultar de la competencia por el alimento entre los organismos en cautiverio. Así, es posible que en los experimentos con *P. sphenops*, la ración de alimento proporcionada al 5% de la biomasa fuera subóptima o es bien posible que ocurrieran interacciones jerárquicas propiciando así el desarrollo de gónadas anormales.

Otra causa probable del desarrollo de organismos intersexuados o de la incapacidad de transformar el sexo se relaciona con el periodo sensible a la inducción. En *P. reticulata*, la inducción del sexo con EE es efectiva durante los últimos 5 a 10 días del periodo de gestación (Kavumpurath y Pandian, 1993). En *P. sphenops* se ha logrado transformar el sexo suministrando  $\beta$ -estradiol (E2) durante los 30 días siguientes al nacimiento (George y Pandian, 1995). En la presente investigación, es muy probable que en los primeros días de vida de *P. sphenops* se encuentre el periodo de máxima sensibilidad para inducir el sexo, ya que la transformación fue efectiva cuando los esteroides se suministraron inmediatamente después del nacimiento y durante los siguientes cuarenta días.

Si se considera que en *P. sphenops* casi el 36% de la población se diferenció naturalmente como machos, el esteroide EE produjo la transformación del 58 al 100% en hembras, el mayor porcentaje de transformación con la mínima dosis ocurrió en  $160 \text{ mg kg}^{-1}$ . Al respecto, Kavumpurath y Pandian (1993) expusieron a hembras grávidas de *P. reticulata* al efecto de diferentes estrógenos en concentraciones entre 100 y  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  de alimento durante 5 a 10 días antes del parto y encontraron que EE, dietilstilbestrol (DES) y  $\beta$ -estradiol (E2) indujeron

el 100% de hembras, siendo el estrógeno más efectivo el EE ya que la dosis más baja de 200 mg kg<sup>-1</sup> indujo la máxima transformación. Contrariamente el β-estradiol 3-benzoato no alteró la proporción sexual de la progenie, aún cuando las concentraciones fueron altas (600-800 mg kg<sup>-1</sup>). George y Pandian (1995) probaron el efecto del E2 y DES en *P. sphenops* y encontraron que E2 fue más efectivo ya que produjo los porcentajes más bajos de mortalidad y con las concentraciones de 200 a 400 mg kg<sup>-1</sup> se desarrollaron el 100% de hembras.

La inducción del sexo masculino en diferentes especies ha sido exitosa con la administración de la 17 α metiltestosterona, en cambio, la inducción de hembras con estrógenos, con frecuencia es parcial o no tiene éxito. Una explicación posible puede estar relacionada con la "hipótesis del sexo naturalmente inducido", de acuerdo con la cual, la gónada indiferenciada XX, en ausencia de un factor inductor masculino (andrógeno) se diferenciará como un ovario. En cambio, en la gónada indiferenciada XY el desarrollo testicular con su capacidad intrínseca de producir esteroides, no puede ser contrarrestado aún cuando se suministren estrógenos exógenos (Komen y Richter, 1993). De igual manera, en *P. sphenops* las concentraciones de 80 y 120 mg kg<sup>-1</sup> de EE no logran contrarrestar la fuerza determinante de los cromosomas ZZ del macho. Cuando la concentración es mayor (200 y 400 mg kg<sup>-1</sup>) la resistencia al cambio de sexo se vence y se desarrollan organismos intersexuados, en los que predomina el tejido masculino.

Al comparar el desarrollo de las gónadas del grupo control (Fig. 8A) con aquellas de los organismos de edad similar pero expuestos al efecto del EE, se observó un desarrollo precoz que fue muy evidente en la concentración más alta (400 mg kg<sup>-1</sup>; Fig. 13B) y que se caracterizó por la ocurrencia de ovocitos vitelados. Se conoce que la vitelogénesis en los peces es inducida en forma directa por el estradiol; en condiciones normales (control) esta hormona producida por el folículo ovárico es liberada a la sangre y estimula en las células hepáticas la producción de la vitelogenina (glucolipofosfoproteína precursora del vitelo). Esta sustancia penetra la membrana del ovocito a través de las capas foliculares y se enlaza a un

receptor (Vtg) que facilita su incorporación por endocitosis (Jobling, 1995; Kraak et al., 1997). Es posible que el suministro de EE en dosis elevadas ( $400 \text{ mg kg}^{-1}$ ) activaran y aceleraran la vitelogénesis y el proceso de desarrollo ovárico. Al respecto se ha observado un efecto similar en *Odontesthes bonariensis* cuando se suministran  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $17\beta$ -estradiol (Strüssmann et al., 1996). En las gónadas de estos organismos hubo un desarrollo precoz de la cavidad ovárica y de los ovocitos en comparación con los controles de la misma edad.

Se ha observado una mortalidad del 30% después de suministrar una dosis de 10 a  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de MT por 57 a 70 días a juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*), pero cuando la dosis fue superior ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) la mortalidad se incrementó hasta un 60% (Piferrer et al., 1986). Dicha mortalidad es similar (52 al 68%) a la observada en *L. reticulatus* (Clemens et al., 1966) al suministrar metiltestosterona en una concentración de 20 a  $30 \mu\text{g g}^{-1}$  durante 146 días. En el presente trabajo la mortalidad de *Poecilia sphenops* fue menor en las diferentes concentraciones de MT (0 a 13%) y es posible que esta diferencia sea consecuencia del menor periodo de exposición al andrógeno (40 días).

La proporción sexual de *L. reticulatus* cambió de  $1.3\text{♀}:1\text{♂}$  en el control a  $9.0\text{♀}:1\text{♂}$  con diferentes dosis de metiltestosterona (Clemens et al. 1966), pero en estos resultados no se consideraron los efectos que produce la hormona en la morfología de las gónadas, ya que de 58 machos, aproximadamente el 80% produjeron esperma y sólo el 14% engendró descendencia. Es posible que la incapacidad de estos organismos para reproducirse tenga su origen en algún trastorno relacionado con el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

Cuando se suministró MT a *P. sphenops*, en todas las concentraciones se desarrollaron organismos intersexuados (8 a 20%). El 58% de los peces expuestos a  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  preliminarmente clasificados como hembras, porque no tenían un gonopodio conspicuo, desarrollaron un testículo. De manera adicional, cuando uno de los organismos, erróneamente clasificado como macho (por el

desarrollo de su gonopodio) se trató de cruzar con una hembra, no la cortejó ni se apareó con ella. Transcurridas varias semanas, cuando este macho desarrolló un vientre abultado, característico de una hembra sexualmente madura, la hembra fue remplazada por un macho maduro que la cortejó e intentó copular sin éxito. El examen histológico de las gónadas de este organismo confirmó que se trataba de un intersexuado (Fig 18A y B). Por lo tanto, las observaciones de Clemens *et al.* (1966) que se refieren a la ausencia de un cortejo en los organismos que producían esperma y que fueron incapaces de copular y engendrar descendencia, pueden estar relacionadas con la imprecisión en la clasificación de los organismos inducidos, ya que al tomar en cuenta sólo los caracteres sexuales secundarios o la verificación de la funcionalidad de los testículos, no se corroboró con un análisis histológico la coexistencia de tejido ovárico.

El análisis histológico de las gónadas de *P. sphenops* indicó que cuando se suministró MT no se desarrollaron hembras, en cambio en todas las concentraciones se observaron organismos intersexuados. Los cortes histológicos de las gónadas intersexuadas de *P. sphenops* revelaron que el tejido testicular siempre fue dominante, con algunas pequeñas áreas de tejido ovárico, lo cual contrasta con lo observado en el salmón *Salmo salar*, cuya gónada inmadura era predominantemente femenina con pequeñas áreas de tejido masculino (Johnston y Maclachlan, 1994). La diferencia entre las gónadas intersexuadas de estos organismos no ha sido explicada aún; sin embargo, es posible que exista relación con el mecanismo de determinación del sexo (XY y WZ). Acorde a la "hipótesis del sexo naturalmente inducido" (Komen y Richter, 1993), el 60 % de la fracción de organismos WZ (Fig. 7 porción inferior) debieron ser menos susceptibles a la transformación, pero como lo mencionan Austin *et al.* (1981) aunque el modo de acción de los cromosomas sexuales es poco claro, al comparar el efecto de los cromosomas W (en aves) y Y (en humanos), encontraron que cuando un pollo es triploide con los cromosomas sexuales ZZW desarrolla una gónada de apariencia intersexuada, pero que sólo contiene tejido testicular. En cambio, un ser humano triploide recién nacido con cromosomas sexuales XXY (n=69) tiene testículos,

aunque los genitales externos sean ambiguos. En contraste, un ser humano diploide con un cromosoma sexual adicional ( 47, XXY) es un macho normal. El hecho que los pollos triploides con un cromosoma W tengan testículos en lugar de ovarios, sugiere que el cromosoma W puede ser un determinante sexual menos poderoso que el cromosoma Y de los machos heteromórficos.

Hamaguchi y Egami (1980) aplicaron un tratamiento de metiltestosterona a juveniles de la especie ginogenética *P. formosa* en una concentración de  $30 \mu\text{g g}^{-1}$  de alimento durante 137 días con la finalidad de inducir la generación de machos (neomachos) y únicamente observaron transformaciones importantes en la estructura de la aleta anal; además observaron alteraciones en los ovarios que se caracterizaron por tener mayor tamaño que el control y también porque la cavidad ovárica se expandió al llenarse de un fluido coloidal eosinofílico, pero no ocurrió el desarrollo de tejido espermático. En el presente trabajo, al suministrar MT a *P. sphenops* no se desarrollaron hembras, pero en la gónada se observó un proceso de maduración precoz con una gran cantidad de conductos eferentes llenos de espermátóforos. En los organismos con gónadas intersexuadas se constataron grandes áreas con vacuolas y la proliferación de tejidos intersticial.

En diferentes especies de peces, el periodo sensible para la inducción de machos con el suministro de andrógenos está circunscrito a los primeros días de vida posteriores a la eclosión (Piferrer y Donaldson, 1989; Gomelsky *et al.* 1994). En *P. sphenops*, estudiada en esta investigación, el suministro de MT durante los 40 días siguientes al nacimiento logró inducir el sexo masculino en el 69 al 88 % de los organismos en tanto que el grupo control estaba compuesto sólo por hembras. Por otra parte, Takahashi (1975a, b) logró un 100% de reversión de hembras a neomachos de *P. reticulata* aplicando una dosis prenatal de 11-ketotestosterona a una concentración de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de dieta durante 8 a 10 días. Así, es posible suponer la existencia de diferencias interespecíficas en cuanto al momento en que ocurre la diferenciación del sexo como lo señaló Nakamura (1994). En hembras del salmón *Oncorhynchus rhodurus*, la transformación en machos con  $400 \mu\text{g l}^{-1}$

de MT fue efectiva cuando se suministró en baños de 2 h en diferentes periodos. Entre los días 3-14 y 22 logró una inducción de machos del 10 al 25% y un 55 % el día 17. Estos resultados indican que el periodo de susceptibilidad a los andrógenos exógenos difiere entre individuos de esta especie, por lo que recomienda un tratamiento de mayor duración para obtener el 100% de inducción. En *P. sphenops* la exposición de los peces durante 40 días a los esteroides no resultó en un 100 % de transformación, pero indujo trastornos en la estructura histológica de las gónadas y alteraciones en la morfología externa.

El efecto de la  $17\alpha$  metiltestosterona sobre el crecimiento de *P. sphenops* coincide con lo observado para otras especies; por ejemplo, la tasa de crecimiento de *L. reticulatus* se redujo cuando se alimentó con dietas que contenían 20, 25 y 30  $\mu\text{g}$  de metiltestosterona en el alimento (g) (Clemens *et al.*, 1966). De manera similar Piferrer *et al.* (1990) encontraron que el suministro de 30 mg de MT  $\text{kg}^{-1}$  de alimento redujo el crecimiento de los juveniles de lubina *Dicentrarchus labrax* y que en dosis bajas ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), el crecimiento fue mayor que el de los controles pero no significativo. Piferrer y Donaldson (1991) encontraron un incremento significativo en masa, en longitud y en el factor de condición en grupos del salmón *Oncorhynchus kisutch*, tratados con dosis altas de MT. En contraste Lim *et al.* (1992) encontraron que la administración de MT no tuvo efectos significativos sobre el crecimiento de *Xiphophorus helleri*, aunque la masa promedio de los organismos tendió a disminuir. En estos trabajos no se describen cambios morfológicos de la anatomía externa de los organismos tratados con las diferentes dosis de esteroides.

Según Higgs *et al.* (1982) se ha utilizado MT con el fin de acelerar el crecimiento de varios teleósteos, pero es necesario tener en cuenta que este esteroide es anabólico en dosis bajas (Matty y Lone, 1985) y catabólico en dosis altas, lo que causa una reducción del crecimiento (Lim *et al.*, 1992). Piferrer *et al.* (1990) estudiaron diferentes índices de condición somática (índice de grasa- IG; hepatosomático- IHS; gonadosomático- IGS y de organismos sin vísceras- IC) y

únicamente encontraron un efecto dependiente de la dosis de MT sobre el IG e IHS; la sobrevivencia y el aspecto externo no fueron afectados y el IC no se modificó, por lo que no influyó en las partes comestibles de los animales.

Así, las altas dosis de esteroides disminuyen las tasas de crecimiento, pero también tienen efectos colaterales sobre otras características de los organismos. Clemens *et al.* (1966) observaron en *Lebistes reticulatus* (sin. *P. reticulata*) que el crecimiento de la aleta anal aumentaba después de 60 días del tratamiento con metiltestosterona en comparación con los organismos control. Transcurridos 60 días más sin esteroides, los organismos control desarrollaron una aleta más grande que cualquiera de los tratados con hormonas. Por otra parte, se conoce que la población de *Poecilia formosa* sólo se reproduce por ginogénesis y está constituida sólo por hembras, a las cuales cuando se les suministran  $30 \mu\text{g g}^{-1}$  de MT en el alimento se observó la transformación de la aleta anal en un gonopodio (Hamaguchi y Egami, 1980).

En el presente estudio, se observaron procesos de deformación en las aletas y el cuerpo de *P. sphenops* cuando se suministró MT; sin embargo, no se comprobó una dependencia de la deformación con la concentración de la hormona suministrada. Al respecto, el análisis de clasificación de las dosis fue  $80 < 120 < 200 < 800 < 160 < 400$ . Así, dosis altas de MT ( $>120 \text{ mg kg}^{-1}$ ) afectaron la estructura corporal de los organismos, incluyendo la malformación o la supresión del desarrollo del gonopodio lo cual imposibilita la reproducción.

Los esteroides también pueden afectar la conducta sexual de los organismos (Liley, 1969). En *L. reticulatus* (sin. *P. reticulata*) se ha observado una alteración de la conducta sexual asociada con la exposición a la metiltestosterona (Clemens *et al.*, 1966); comparativamente *P. sphenops* tratados con  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de MT no se reprodujeron y en algunos casos no se observó el cortejo característico de la especie.

Con respecto a los estrógenos el tratamiento de *P. sphenops* con diferentes concentraciones de EE por 40 días redujo el crecimiento en comparación con el grupo control. En *Xiphophorus helleri* el estrógeno 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) provocó un crecimiento insignificante en relación con un incremento en la concentración (Lim *et al.* 1992). La diferencia puede estar relacionada con la potencia inductora de EE que es 3.5 veces superior a  $E_2$  (Yamamoto, 1969). Piferrer y Donaldson (1992) expusieron al salmón "chinook" (*Oncorhynchus tshawytscha*) de un día de edad a una dosis de 400  $\mu\text{g}$  de  $E_2$  o EE y únicamente observaron incrementos significativos en el crecimiento para aquellos tratados con EE.

Los resultados obtenidos en la presente investigación y los observados por otros investigadores indican que el crecimiento de los organismos no tiene una relación directa con la concentración del esteroide empleado. Cuando se suministran dosis altas es frecuente que ocurra una disminución de la talla o de la biomasa. En *Poecilia sphenops* las dosis de esteroides (EE y MT) superiores a los 80  $\text{mg kg}^{-1}$  redujeron el crecimiento y, particularmente con la MT, ocurrieron alteraciones importantes en la anatomía de los organismos tratados. Es recomendable que para encontrar la dosis más adecuada para transformar el sexo de los peces y evitar efectos secundarios adversos, se consideren el momento de máxima sensibilidad a la inducción, la dosificación del esteroide y la duración del tratamiento.

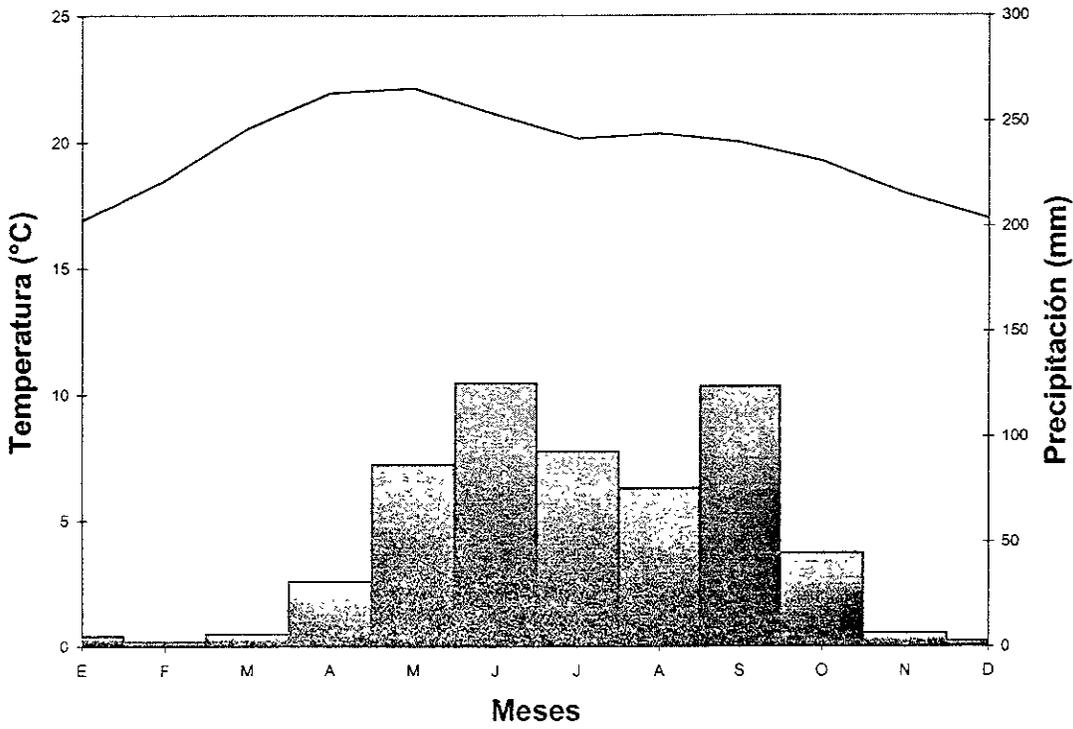


Figura 23. Climograma para las estaciones meteorológicas E20-061 Oaxaca y E20-129 Tlacolula. Temperatura (—); Precipitación (■) (modificado de García, 1973).

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DEL SEXO EN *Poecilia sphenops*

Desde hace más de 60 años se ha demostrado que la administración de hormonas sexuales influye en la determinación del sexo de los peces, lo cual evidentemente tiene aplicación en Acuicultura. Al respecto, existen diferentes técnicas que permiten obtener machos o hembras con características morfológicas o fisiológicas deseables para sistemas de cultivo particulares, entre las que destacan el manejo de cromosomas y la administración de hormonas (Yamamoto, 1969; Donaldson y Hunter, 1982; Hunter y Donaldson, 1983; Yamazaki, 1976, 1983; Piferrer y Donaldson, 1988). Por ejemplo, la inducción sexual sería beneficiosa en peces de ornato con alto valor comercial; en estas especies los machos tienen, generalmente, colores más brillantes y aletas más grandes que las hembras como en *P. reticulata* (sin. *L. reticulatus*), *Xiphophorus maculatus* y *Betta splendens*. Otro ejemplo lo constituyen los salmónidos, que sustentan una de las industrias acuícolas más desarrolladas del mundo, donde el control sexual es importante debido al comportamiento migratorio reproductivo de las especies, consecuencia de lo cual es la muerte de machos y la reducción del crecimiento de las hembras, así como la disminución de la calidad de la carne. Un aspecto importante que también se debe examinar es la reproducción precoz, con consecuencias indeseables, de los cíclidos de los géneros *Tilapia* y *Oreochromis*, que tienen un gran potencial en Acuicultura (Hunter y Donaldson, 1983; Blazquez *et al.*, 1995; Al-ablani y Phelps, 1997; Gomelsky *et al.*, 1999).

Uno de los procedimientos para transformar el sexo de *P. sphenops* consiste en controlar las características fisicoquímicas del ambiente en el que se desarrolla la especie. Para lograr una mayor producción de hembras el pH y la temperatura deben mantenerse entre 22 y 30 °C y pH 7. Para inducir una mayor proporción de machos es necesario mantener el cultivo entre 22 y 26 °C y pH 8 y para obtener una proporción sexual cercana a la unidad, las condiciones ambientales del cultivo deben ser 22 °C y pH 8. De acuerdo con las evidencias aportadas en este trabajo,

el control ambiental del sexo no promueve la transformación en el 100% de los peces. En este sentido, es necesario continuar investigando el efecto de diferentes niveles de estos factores y de otros, para perfeccionar un procedimiento que promueva el desarrollo de un sexo en particular.

Para lograr la inducción sexual de los peces es necesario tomar en cuenta varios factores que influyen en el procedimiento, tales como, el periodo de máxima sensibilidad de los especímenes, el tipo y características de los esteroides a utilizar y la dosis a emplear, con el fin de evitar efectos secundarios. También es necesario considerar la vía de administración y la disponibilidad de las hormonas en el mercado, así como el coste económico.

Para la mayoría de las especies estudiadas, la etapa del desarrollo en que el tejido gonadal es sensible corresponde al momento de la eclosión en las especies ovíparas y del nacimiento en las vivíparas. Sin embargo, varios autores indican que en los cíclidos, *Oreochromis*, *Tilapia* y *Sarotherodon* es recomendable que el estímulo inductor se aplique durante el primer mes de vida libre o cuando los alevines tienen 9 a 12 mm de longitud, ya sea vía alimento o a través de baños (Odunze y Antony, 1985; Meyer, 1991; Rosenstein y Hulata, 1993; Vera-Cruz y Mair, 1994). En *P. sphenops* se puede inducir el sexo si durante los cuarenta días posteriores al nacimiento se suministran andrógenos o estrógenos, periodo en que los peces son sensibles a la inducción.

Con respecto al tipo de esteroides, los más utilizados en la actualidad son los sintéticos como los estrógenos 17  $\alpha$ -etinilestradiol y etilbestrol y los andrógenos 17  $\alpha$ -metilt testosterona, androstenediona, propionato de testosterona, metilandrostenediol y 19-noretinilt testosterona (Yamamoto, 1969; Hunter y Donaldson, 1983; Guerrero y Guerrero, 1993; Sehgal *et al.*, 1995). Los esteroides sintéticos se prefieren a los naturales debido a que tienen una mayor potencia inductora, probablemente debido a que los esteroides naturales son metabolizados por el organismo (Yamazaki, 1983; Piferrer y Donaldson, 1988).

Los esteroides sintéticos  $17\alpha$  etinilestradiol y  $17\alpha$  metiltestosterona inducen el sexo en *P. sphenops*, pero existen otros esteroides que podrían ser empleados tomando en cuenta su potencia, el coste y la disponibilidad.

En referencia al modo de empleo de los esteroides, las formas más eficaces son la administración vía alimento, ya sea incorporando los esteroides en el alimento balanceado o bien utilizando como vehículo nauplios de *Artemia*. También se ha empleado la exposición de los especímenes a soluciones de las hormonas a través de baños, en aquellas especies cuya sensibilidad es mayor antes de la eclosión o inmediatamente después (Hunter y Donaldson, 1983; Baker *et al.*, 1988; Piferrer y Donaldson, 1989 y 1992; Meyer, 1991; Rosenstein y Hulata, 1993; Gomelsky *et al.*, 1999).

Cabe señalar que además de los factores mencionados el éxito de la inducción hormonal del sexo depende de la especie. En los peces de las tres familias más estudiadas, Cyprinidae, Cichlidae y Salmonidae, se logró la transformación del sexo con diferentes concentraciones de esteroides y vías de administración.

En lo concerniente a las dosis a emplear, en algunas especies se requieren concentraciones muy pequeñas para alterar la proporción sexual como en el salmón *Oncorhynchus tshawytscha* donde el 82 a 100% de machos se obtuvo con una dosis de  $200\ \mu\text{g l}^{-1}$  de MT (Piferrer y Donaldson, 1988); en cambio en el pez de ornato *Xiphophorus helleri* se requirieron  $750\ \text{mg}$  de MT por  $\text{kg}^{-1}$  de alimento, suministrado durante 10 días (Lim *et al.*, 1992).

Cuando las hormonas se administran con el alimento, los salmones requirieron dosis de  $1$  a  $50\ \text{mg kg}^{-1}$ , las carpas  $100$  a  $300\ \text{mg kg}^{-1}$  y las mojarra  $50$  a  $100\ \text{mg kg}^{-1}$  (Meyer, 1991; Rosenstein y Hulata, 1993; Sobhnana y Nandeesha, 1994; Vera-Cruz y Mair, 1994; Basavaraja *et al.*, 1997; Gimeno *et al.*, 1998). En *Poecilia sphenops* una dosis de  $160\ \text{mg kg}^{-1}$  de EE es suficiente para inducir la producción de hembras, concentraciones mayores provocan mortalidades importantes, que

pueden ser del 100% cuando la concentración es de  $800 \text{ mg kg}^{-1}$ . Con una dosis de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de MT se obtendrán un 83% de machos y 17% de organismos intersexuados.

En general, los esteroides administrados en dosis altas pueden producir efectos deletéreos con un aumento de la tasa de mortalidad (Guerrero y Guerrero, 1993) y efectos adversos como la degeneración del tejido ovárico (Kramer *et al.*, 1988), esterilidad en las carpas y salmones (Solar *et al.*, 1984; Das *et al.*, 1990; Basavaraja *et al.*, 1997) y reducción del crecimiento (Abdelghany, 1995; Guerrero y Guerrero, 1993). También se han observado individuos intersexuados (Garret, 1989; Alam y Monwar, 1998; Blazquez *et al.*, 1998; Hartley *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha constatado que altas dosis de andrógenos producen efectos anabólicos aumentando la tasa de crecimiento en algunas especies (Meyer, 1991; Ron *et al.*, 1995; Degani, 1986). Si se suministran en *P. sphenops* dosis superiores a  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  de MT se producirán ligeros incrementos en la mortalidad (13%), alteraciones en la estructura histológica de las gónadas y en la morfología externa de los peces.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abdelghany, A.E. 1995. Effects of feeding 17  $\alpha$  methyltestosterone and withdrawal on feed utilization and growth of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., fingerlings. *J. Appl. Aquacult.* 5:67-74.
- Adkins-Regan, E. 1987. Hormones and sexual differentiation. In: *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles.* (Norris, D.O. and Jones, R. E., eds.) pp. 1-29. Plenum Press. New York.
- Al-ablani, S.A. and Phelps, R.P. 1997. Sex reversal in black crappie *Pomoxis nigromaculatus*: effect of oral administration of 17  $\alpha$ -methyltestosterone on two age classes. *Aquaculture.* 158:155-165.
- Alam, Md. S. and Monwar, M.K. 1998. Effects of mesterolone on growth and sex ratio of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus). *Indian J. Fish.* 45:293-299.
- Alvarez, J. 1970. *Peces mexicanos (Claves).* Instituto Nacional de Investigaciones Biológicas y Pesqueras, Secretaria de Industria y Comercio. México, D.F. Estudio 1, 166 p.
- Austin, C.R., Edwards, R.G. and Mittwoch, U. 1981. Introduction. In: *Mechanisms of sex differentiation in animals and man.* (Austin, R.R. and Edwards, R.G., eds) pp. 1-54. Academic Press, London.
- Baker, I.J., Solar, I.I. and Donaldson, E.M. 1988. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17  $\alpha$ -methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture.* 72:359-367.
- Balon, E.K. 1975. Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32:821-864.
- Balon, E.K. 1981. Additions and amendments to the classification of reproductive styles in fishes. *Env. Bd. Canada.* 32:821-864.
- Balsano, J.S., E.J. Randle, E.M. Rasch and P.J. Monaco. 1985. Reproductive behavior and the maintenance of all-female *Poecilia*. *Environ. Biol. Fishes.* 12:251-263.
- Basavaraja, N., Gangadhar, B. and Udupa, K.S. 1997. Effect of diethylstilbestrol incorporated diet on sex ratio and body composition of common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Aquacult. Trop.* 12:209-218.
- Blackwelder, R.E. and Shepherd, B.A. 1981. *The diversity of animal reproduction.* CCR Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. 141 p.

- Blazquez, M., Zanuy, S., Carillo, M. and Piferrer, F. 1998. Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17  $\beta$  and 17  $\alpha$ -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiol. Biochem.* 18:37-47.
- Blazquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M. and Donaldson, E.M. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: Effects of dietary 17  $\alpha$ -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture.* 135:329-342.
- Breder, C.M.Jr. and C.W. Coates. 1932. A preliminary study of population stability and sex ratio of *Lebistes*. *Copeia.* 3:147-155.
- Burkitt, H.G., Young, B. and Heath, J.W. 1993. Wheater's functional histology. A text and colour atlas. Churchill Livingstone, Edinburg. 407 pp.
- Chan, S.T.H. and Wai-Sum, O. 1981. Environmental and non-genetic mechanisms in sex determination. In: Mechanisms of sex differentiation in animals and man. (Austin, R.R. and Edwards, R.G., eds). pp. 55-111. Academic Press, London.
- Clemens, H.P., McDermitt, C. and Inslee, T. 1966. The effects of feeding methyltestosterone to guppies for sixty days after birth. *Copeia.* 2:280-284.
- Conover, D.O., and Kynard, B.E. 1981. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in fish. *Science* 213:577-579.
- Conover, D.O., and Heins, S.W.. 1987. The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia* (Pisces: Atherinidae). *Copeia.* 1987:732-743.
- Constantz, G.D. 1979. Life history patterns of a livebearing fish in contrasting environments. *Oecologia* 40:189-201.
- Constantz, G.D. 1989. Reproductive biology of poeciliid fishes. In: Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae). Meffe G.K. and Snelson F.F.Jr. eds. pp. 33-50. Prentice Hall. New York.
- Darlington, P.J. 1957. Zoogeography: the geographic distribution of animals. John Wiley & Sons, Inc. New York. 675 p.
- Darnell, R.M. 1962. Fishes of the Río Tamesí and related coastal lagoons in east-central Mexico. *Pub. Inst. Mar. Sci.* 8:299-365.

ESTADÍSTICAS NO SEAN  
DE LA BIBLIOTECA

- Das, S.K. Shetty, H.P.C. and Nandeesh, M.C. 1990. Production of female-free common carp, *Cyprinus carpio* var. *communis* (L.) through dietary administration of the androgen mibolerone. *Asian Fish. Sci.* 3:197-203
- Degani, G. 1986. Effect of dietary 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -methyltestosterone on growth and body composition of slow growing elvers (*Anguilla anguilla* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 85A:243-247.
- Donaldson, E.M. and G.A. Hunter, 1982. Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:99-110.
- Farr, J.A. 1981. Biased sex ratios in laboratory strains of guppies, *Poecilia reticulata*. *Heredity.* 47:237-248.
- García, E. 1973. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la Republica Mexicana) UNAM. Mexico. 357 p.
- Garrett, G.P. 1989. Hormonal sex control of largemouth bass. *Prog. Fish Cult.* 51:146-148.
- Gauch, Jr. H.G. 1984. *Multivariate analysis in community ecology.* Cambridge University Press, New York. 298 pp.
- George, T. and Pandian, T.J. 1995. Production of ZZ females in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops*, by endocrine sex reversal and progeny testing. *Aquaculture.* 136:81-90.
- Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A.G.M. and Bowmer, T. 1998. Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquat. Toxicol.* 43:77-92.
- Gomelsky, B., Cherfas, N.B., Gissis, A. and Hulata, G. 1999. Hormonal sex inversion in striped bass and white bass x striped bass hybrids. *N. Am. J. Aquacult.* 61:199-205.
- Gomelsky, B., Cherfas, N.B., Peretz, Y., Ben-Dom, N. and Hulata, G. 1994. Hormonal sex inversion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture.* 126:265-270.
- Guerrero, R.D., III; Guerrero, L.A. 1993. Effect of oral treatment of mibolerone on sex reversal of *Oreochromis mossambicus*. *Asian Fish. Sci.* 6:347-350.
- Hamaguchi, S. and Egami, N. 1980. The male secondary sex characteristics in the gynogenetic female fish, *Poecilia formosa*, induced by the administration of methyltestosterone. *Anotationes Zoologicae Japonenses.* 53:227-230.

- Hartley, W.R., Thiagarajah, A., Anderson, M.B., Broxson, M.W., Major, S.E. and Zell, S.I. 1998. Gonadal development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17  $\beta$ -estradiol. *Mar. Environ. Res.* 46:145-148
- Hattori, A. 1994. Inter-group movement and mate acquisition tactics of the protandrous anemofish, *Amphiprion clarkii*, on a coral reef, Okinawa. *Japan. J. Ictiol.* 41:159-165.
- Higgs, D.A. Fagerlund, U.H.M., Eales, J.G. and McBride, J.R. 1982. Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B:143-176.
- Hoar, W.S. 1969. Reproduction. In: *Fish physiology*, Vol. III. (Hoar, W.S. and Randall, D.J. eds) pp: 1-72. Academic Press, London.
- Hunter, G.A. and Donaldson, E.M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: *Fish Physiology*. (Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.D., eds). pp. 223-303. Academic Press. London.
- Hutchinson, G.E. 1957. *A Treatise of Limnology*. Vol. 1. John Wiley and Sons. New York. 1015 pp.
- Jobling, M. 1995. *Environmental biology of fishes*. Primera edición. Chapman y Hall, U.S.A. 455 p.
- Johnstone, R. and Maclachlan, P.M. 1994. Further observations on the sex inversion of atlantic salmon, *Salmo salar* L., using 17 $\alpha$  metiltestosterone. *Aquaculture and Fisheries Management*. 25:855-859.
- Kavumpurath, S. and Pandian, T.J. 1993. Production of a YY female guppy, *Poecilia reticulata*, by endocrine sex reversal and progeny testing. *Aquaculture*. 118:183-189.
- Kirpichnikov, V.S. 1981. *Genetic bases of fish selection*. Springer-Verlag. Berlin. 410 p.
- Komen, J. and Richter, C.J. 1993. Sex control in Carp. In: *Recent advances in aquaculture*. Vol. 4. (Muir, J.F. and Roberts, R.J. eds.). pp:78-86. Blackwell Scientific Pub. Oxford, U.K.
- Kraak, G.V.D., Chang, J.P. and Janz, D.M. 1997. Reproduction. In: *The physiology of fishes*. (Evans, D.H. ed.). pp: 465-488. CRC Press. Boca Raton.
- Kramer, C.R., Koulis, S. and Bertacchi, P.L. 1988. The effects of testosterone implants on ovarian morphology in the bluehead wrasse, *Thalassoma bifasciatum* (Bloch) (Teleostei: Labridae). *J. Fish Biol.* 32:397-407

- Liley, N.R. 1969. Hormones and reproductive behavior in fishes. In: Fish Physiology, Vol 3, Reproduction (W.S. Hoar and D.J. Randall, eds) pp. 73-116. Academic Press, New York.
- Lim, B.H., Phang, V.P.E. and Reddy, P.K. 1992. The effects of short-term treatment of 17 $\alpha$ -methyltestosterone and 17  $\beta$ -estradiol on growth and sex ratio in the red variety of swordtail, *Xiphophorus helleri*. J. Aqua. Trop., 7:267-274.
- Marañón, H.S., Maya, P.E. y Salgado, Z.H. 1999. Masculinización de *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae) inducida por los esteroides norgestrel y androstenediona. Hidrobiológica 9:31-38
- Mathews, Ch.K and Van Holde, K.E. 1996. Biochemistry. Second edition. The Benajmin Cummings Publishing Company, Inc. California, USA. pp: 659-697.
- Matty, A. and K. P. Lone. 1985. Hormonal control of protein deposition. In: Nutrition and Feeding in Fish. (C.B. Cowey, A.M. Mackie and J.B. Bell. Eds). Academic Press, London. p. 147-167.
- Meffe G.K. and Snelson, F.J. Jr. 1989. An ecological overview of poeciliid fishes. In: Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae). Meffe G.K. and Snelson, F.J.Jr. (eds.) pp. 13-31. Prentice Hall, New York.
- Meyer, D.E. 1991. Growth, survival and sex ratios of *Tilapia hornorum*, *Tilapia nilotica* and their hybrid (*T. nilotica* female x *T. hornorum* male) treated with 17-alpha-methyltestosterone. Auburn University. Diss. Abst. Int. Pt. B Sci. andEng. 51(11), 75 pp.
- Miller, R.R. 1966. Geographical distribution of central american freshwater fishes. Copeia. 4:773-802.
- Miller, R.R. and Schultz, R.J. 1959. All-female strains of the teleost fishes of the genus *Poeciliopsis*. Science. 130:1656-1657.
- Nakamura, M. 1994. A study of susceptibility of sex reversal after a single 2-hour treatment of androgen in Amago Salmon. Fish. Sci. 60:483-484.
- NOAA. 1983. Technical Memorandum. Histological techniques for marine bivalve mollusks. NMFS-F/NEC-25. U.S. Department of Commerce.
- Oduze, F.C.; Antony, A.D. 1985. Hormonal control of breeding (by sex reversal method) in *Sarotherodon niloticus* (L.). Natsya. 11:56-62.
- Pandian, T.J. 1993. Application of biotechnology for fish production. Advances in Fish Research. 1:387-400.

- Piferrer, F., Carrillo, M. y Zanuy, S. 1986. Efectos de inyecciones de 17  $\alpha$ -metiltestosterona sobre el aspecto externo y el crecimiento de juveniles de Lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). *Inv. Pesq.* 50:213-225.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1988. Progress in the development of sex control techniques for the culture of Pacific salmon. *Proc. Aquaculture Int. Congr. Exp.*, Vancouver, B.C.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Onchorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture.* 77:251-262.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1991. Dosage-dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol. And Biochem.* 9:145-150.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1992. The comparative effectiveness of natural and a synthetic estrogen for the direct feminization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture.* 106:183-193.
- Piferrer, F., Hofstede, P., Carrillo, M. y Zanuy, S. 1990. Tratamiento de juveniles de lubina en el periodo de su diferenciación sexual con metiltestosterona, efecto sobre el fenotipo y sobre algunos índices somáticos y de crecimiento. Santiago de Compostela, España. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.* 75-80.
- Randal, D.J. and Lin, H. 1993. Effects of variations in water pH on fish. In: *Coastal and Estuarine Studies 43. Aquaculture: Fundamental and applied research.* (Lahlou, B. and Vitiello, P. eds.) p 31-45. American Geophysical Union, Washington, D.C.
- Rishi, K.K. and Gaur, P. 1976. Cytological female heterogamety in jet-black molly, *Mollienesia sphenops*. *Curr. Sci.* 45:669-670.
- Ron, B., Shimoda, S.K., Iwama, G.K. and Gordon-Grau, E. 1995. Relationships among ration, salinity, 17  $\alpha$ -ethyltestosterone and growth in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture.* 135:185-193.
- Rosenstein, S. and Hulata, G. 1993. Sex reversal in the genus *Oreochromis*: optimization of feminization protocol. *Aquaculture and Fisheries Management.* 24:329-339.
- Rubin, D.A. 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlid and poeciliid (Teleostei). *Copeia.* 1:233-235.

- Schultz, R.J. 1993. Genetic regulation of temperature-mediated sex ratios in the livebearing fish *Poeciliopsis lucida*. *Copeia*. 4:1148-1151
- Sehgal, G.K., Saxena, P.K. and Sehgal, H.S. 1995. Hormonal control of sex in common carp and its application to composite fish culture. The Carp. Proceedings of the Second "Aquaculture" Sponsored Symposium held in Budapest, Hungary (Billard, R. and Gall, G.A.E. eds.) vol. 129, no. 1-4 P. 219.
- Silliman, P.R. and Gutsell, S.J. 1958. Experimental exploitation of fish populations. *Fishery Bulletin* 133, 58:214-252.
- Snelson, F.F.Jr. 1989. Social and environmental control of life history traits in poeciliid fishes. In: Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae). Meffe G.K. and Snelson F.F.Jr. eds. pp. 149-161. Prentice Hall. New York.
- Sobhnana, K.S. and Nandeesh, M.C. 1994. Standardization of mibolerone dosage for production of female free common carp (*Cyprinus carpio* var. *communis* L.) and the impact of the hormone on growth and flesh composition. *J.Aquacult.Trop.* 9:133-139.
- Solar, I.I., Donaldson, E.M. and Hunter, G.A. 1984. Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17  $\alpha$ -methyltestosterone. *Aquaculture*. 42:129-139
- Strüssmann, C.A., Takashima, F. and Toda, K. 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*. 139:31-45.
- Sullivan, J.A. and Schultz, R.J. 1986. Genetic and environmental basis of variable sex ratios in laboratory strains of *Poeciliopsis lucida*. *Evolution* 40:152-158.
- Takahashi, H. 1975a. Functional masculinization of female guppies, *Poecilia reticulata* influenced by methyltestosterone before birth. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 41:499-506.
- Takahashi, H. 1975b. Masculinization of the gonad of juvenile guppy, *Poecilia reticulata*, induced by 11-Ketotestosterone. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 26:11-22.
- Takahashi, H. 1975c. Functional feminization of genetic males of the guppy, *Poecilia reticulata*, treated with estrogen after birth. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 26:223-234.
- Vera-Cruz, E.M. and Mair, G.C. 1994. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*. 122:237-248.

- Uizziano, D., Garcia-Alonso J.R. and Carnevia, D. 1995. Effect of cations, pH and osmolality on sperm motility of male white croaker, *Micropogonias furnieri*. Proceedings of the fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas, USA. pp.
- Vatchel, S.S. and Koo, G.C. 1981. H-Y antigen in gonadal differentiation. In: Mechanisms of sex differentiation in animals and man (Austin, C.R. and Edwards, R.G. eds) pp: 255-299. Academic Press, London.
- Vitschi, E. 1967. Biochemistry of sex differentiation in vertebrate embryos. In: The Biochemistry of animal development (R. Weber, ed.) Vol. 2 pp. 193-223. Academic Press, New York.
- Yamamoto, T. 1969. Sex differentiation. In: Fish Physiology, Vol. III. Reproduction (W.S. Hoar and D.J. Randall, eds). pp. 117-175. Academic Press. New York.
- Yamazaki, F. 1976. Application of hormones in fish culture. J. Fish. Res. Board Can. 33:948-958.
- Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquiculture. 33:329-354.
- Zaborski, P. 1982. Expression of H-Y antigen in non mammalian vertebrates and its relation to sex differentiation. In: Proceedings of International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Wageningen, The Netherlands. (Richter, C.J.J. and Goos, H.J.Th., Compilers).pp.64-68. Centre for Agricultural Publishing and Documentation Wageningen.
- Zar, J.H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, U.S.A