

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está 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 o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto de la administración de 17α -etinilestradiol sobre la
proporción sexual de lobina rayada (*Morone saxatilis*)**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
Presenta

Sergio Rodrigo Muñoz Carranza

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Sergio Rodrigo Muñoz Carranza
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dr. Gilberto Curlango Rivera



Dra. Fabiola Lafarga De La Cruz
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Sergio Rodrigo Muñoz Carranza** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Efecto de la administración de 17 α -etinilestradiol sobre la proporción sexual de lobina rayada (Morone saxatilis)

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

La lobina rayada es una especie que se cultiva para la producción de carne. Existe un interés en la producción mayoritaria de hembras, ya que estas presentan un crecimiento y talla mayor al de los machos. Sin embargo, en cultivo se ha observado una mayor producción de machos. Para obtener una mayor producción de hembras, juveniles de lobina rayada con 30 días después de la eclosión (dde) recibieron las concentraciones de 10 y 20 mg/kg en el alimento de la hormona sintética 17 α -etinilestradiol (EE), el cual se administró en tres periodos de 20 días: de 30 a 50 dde, de 45 a 65 dde y de 60 a 80 dde. Con el objetivo de identificar la concentración y el periodo óptimo de administración en el desarrollo. Se realizaron una serie de muestreos a partir de los tratamientos control y experimentales, en los primeros se realizó un muestreo cada tres días, de los 30 a los 81 dde, para comparar el desarrollo gonadal. En los tratamientos experimentales se muestrearon los estanques que estaban bajo la administración de la hormona, al inicio y al final de cada periodo de exposición hormonal. Además, se realizó un muestreo de todos los tratamientos a los 156 dde, para identificar la proporción sexual en cada tratamiento. Se realizó un segundo muestreo a los 195 dde, para confirmar las proporciones sexuales observadas en el muestreo anterior. Las muestras tomadas, se procesaron por histología en parafina y en histología por congelación, se realizaron cortes seriados que se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron en microscopía óptica convencional. Se observó que el tratamiento expuesto a la hormona entre los 30 y 50 dde, a la concentración de 20mg/kg de EE en el alimento, presentó un 80% de hembras, además de tener las longitudes patrón y pesos más altos de todos los tratamientos. En contraste el resto de los tratamientos presentó una proporción sexual de 1:1.

Palabras clave: lobina rayada, 17 α -etinilestradiol, diferenciación sexual, determinación sexual,

Abstract of the thesis presented by **Sergio Rodrigo Muñoz Carranza** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Effect of 17 α -ethinylestradiol administration on the sexual ratio of striped bass (*Morone saxatilis*)

Abstract approved by:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Director

Striped bass is a species farmed for meat production, and there is significant interest in maximizing female production due to their superior growth and size compared to males. However, male production has been observed to be more prevalent in aquaculture. To increase female production of females, juvenile striped bass at 30 dph (days post hatch) were exposed to feed containing synthetic 17 α -ethinyl estradiol (EE) at concentrations of 10 and 20 mg/kg. The hormone was administered over three 20-day periods: from 30 to 50 dph, from 45 to 65 dph, and from 60 to 80 dph. The objective of identifying the optimal concentration and administration period during development. Sampling was conducted from both control and experimental groups. In the control group, samples were taken every three days from 30 to 81 dph to monitor gonadal development. For the experimental groups, the ponds receiving hormone treatment were sampled at the start and end of each exposure period. An additional sample was collected from all treatments at 156 dph to assess the sexual proportion in each group. A second sampling at 195 dph was carried out to confirm the sexual proportions observed in the initial sampling. The collected samples were processed using paraffin and frozen histology, with serial sections stained with hematoxylin and eosin and analyzed under conventional microscopy. Results showed that the treatment group exposed to 20 mg/kg EE in the feed between 30 and 50 dph exhibited 80% females and had the highest standard lengths and weights across all treatments. In contrast, the other treatment groups displayed a 1:1 male-to-female ratio.

Keywords: striped bass, 17 α -ethinyl estradiol, sexual differentiation, sex determination, sex ratio

Dedicatoria

A mi familia y amigos, por ser la fuerza para alcanzar mis metas, por llenarme de inspiración y siempre estar a mi lado cuando los necesito.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por permitirme el uso de las instalaciones, así como de los equipos requeridos para la realización de mi tesis.

Al departamento de Acuicultura del CICESE, por haberme aceptado en la maestría y permitirme hacer uso de sus instalaciones para la realización de mi tesis.

A Pacifico Aquaculture, por donar las larvas de lobina rayada requeridas para la realización de los experimentos de la tesis, así como el alimento que, para la realización del experimento, además de sus consejos para el mantenimiento de los organismos.

A mi director de tesis el Dr. Benjamín Barón Sevilla, por la enorme paciencia que tuvo conmigo, la ayuda que me brindó durante la realización de este proyecto, al esclarecer mis dudas, por los consejos que me dio a lo largo de la maestría, por la oportunidad de apoyarlo en otros proyectos, y por las pláticas y risas que tuvimos.

A mis sinodales la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y al Dr. Gilberto Curlango Rivera, por sus amables revisiones, comentarios y aportes durante el desarrollo de la tesis.

A la M en C. Yanet Guerrero Rentería, por su apoyo técnico, la facilitación de los equipos y reactivos, así como todos los consejos que dio, además de todas los buenos momentos y conversaciones que tuvimos.

Al técnico Francisco Morineau, por su apoyo con los sistemas de cultivo de los que hice uso, así como de los consejos que me dio y las pláticas que tuvimos

A la Dra. Magali Sacarías Sánchez, por toda la ayuda y consejos que me brindó durante la realización de la tesis, así como todas las pláticas y buenos momentos que tuvimos.

A mis amigos de la maestría Noe, Aldo, Nayeli y Helena por todos los momentos que pasamos juntos, sus consejos y ayuda que me brindaron al momento de realizar mis experimentos, su apoyo durante las clases de la maestría, por apoyarme en los momentos difíciles.

A mis compañeros de generación, Angélica, Evelin, Romario, Hillary, Maira, Vitoria y César por los buenos momentos, su compañía y risas que tuvimos juntos

A Nancy y Don Mario por su apoyo al notificarme sobre el estado de los sistemas de cultivo.

A las asistentes del departamento de acuicultura por apoyarme con la realización de trámites y notificarme de pendientes importantes.

Tabla de Contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Abstract.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Determinación sexual en peces	3
1.2 Diferenciación sexual en peces	4
1.3 Antecedentes	5
1.3.1 Reproducción y ciclo de vida de la lobina rayada	5
1.3.2 Métodos para el control de la reproducción y el sexo.....	6
1.3.3 Uso de esteroides sexuales en el cultivo de peces	7
1.3.4 Vías de administración de hormonas exógenas.....	9
1.3.5 Tipos de hormonas exógenas.....	9
1.4 Control del sexo en la lobina rayada	10
1.5 Gonadogénesis y morfología de las gónadas	12
1.5.1 Células germinales primordiales	12
1.5.2 Desarrollo y morfología ovárica	13
1.5.3 Desarrollo y morfología testicular.....	14
1.6 Justificación	14
1.7 Hipótesis.....	15
1.8 Objetivos	15
1.8.1 Objetivo general.....	15

1.8.2	Objetivos específicos.....	15
Capítulo 2.	Metodología.....	16
2.1	Cultivo de lobina rayada (<i>Morone saxatilis</i>).....	16
2.2	Administración de la hormona en el alimento.....	17
2.3	Alimentación de los organismos	18
2.4	Descripción del proceso de desarrollo gonadal	18
2.5	Identificación y descripción de las alteraciones gonadales ocasionadas por la exposición a 17 α -etinilestradiol.....	19
2.6	Biometrías para el monitoreo del estado de los organismos	19
2.7	Identificación y confirmación de las proporciones sexuales.....	20
2.8	Procesamiento de muestras histológicas.....	20
2.8.1	Histología en parafina	20
2.8.2	Histología por congelación.....	21
2.9	Análisis estadístico	21
2.9.1	Análisis de la proporción sexual	21
2.9.2	Análisis de la relación del sexo con la longitud patrón y el peso	22
Capítulo 3.	Resultados	23
3.1	Cultivo de lobina rayada.....	23
3.2	Efectos de la alimentación enriquecida con 17 α -etinilestradiol.....	24
3.3	Identificación del sexo y la proporción sexual	26
3.3.1	Muestreo en el día 156 dde	26
3.3.2	Muestreo en el día 195 dde	30
3.3.3	Muestreo de los tratamientos control a los 130 dde.....	32
3.4	Descripción del desarrollo gonadal	34
3.4.1	Desarrollo gonadal a los 39 dde	34
3.4.2	Desarrollo gonadal a los 60 dde	34
3.4.3	Desarrollo gonadal a los 75 dde	35

3.4.4	Desarrollo gonadal a los 81 dde	36
3.5	Descripción de las alteraciones gonadales por efecto de la exposición al 17 α -etinilestradiol (EE) 36	
3.5.1	Alteraciones gonadales en los periodos de exposición hormonal (30-50 dde; 45-65 dde; 60-80 dde)	37
3.6	Análisis de la relación del sexo con la longitud patrón y el peso	39
3.6.1	Muestreo del día 156 dde	39
3.6.2	Muestreo del día 195 dde	41
Capítulo 4.	Discusión.....	42
4.1	Supervivencia a lo largo del experimento.....	42
4.2	Crecimiento y alimentación	42
4.2.1	Comportamiento durante la alimentación	43
4.2.2	Densidad y el crecimiento de los organismos.....	43
4.3	Proporción de sexos en los tratamientos y factores que afectaron los resultados.....	44
4.3.1	Concentración y duración de la exposición a la hormona.	45
4.3.2	Momento en el desarrollo, para la administración de la hormona.	46
4.3.3	Efecto de la temperatura	47
4.4	Comparación del desarrollo gonadal	48
4.5	Alteraciones del desarrollo gonadal.....	49
4.6	Comparación de la longitud patrón y el peso con el sexo de los organismos de cada tratamiento 51	
Capítulo 5.	Conclusiones	53
Literatura citada		54
Anexos		59

Lista de figuras

Figura	Página
1. Distribución conocida de la lobina rayada: Atlántico occidental: río St. Lawrence en Quebec, Canadá hasta el lago Pontchartrain en Luisiana; al sur de Florida, EE. UU., hasta los desagües de los ríos St. Johns y Suwannee. Distribución en las costas del Pacífico: San Diego, Estados Unidos; hasta Vancouver, Canadá. Además de haber una introducción fallida en las costas Hawaianas. Imagen obtenida de Smithsonian. (s. f.)	1
2. (a) Árbol consenso que muestra la estructura general de los Perciformes. (b) Filograma de los miembros de la familia Moronidae (incluidos los géneros <i>Morone</i> y <i>Dicentrarchus</i>). El árbol inferior se generó a partir de una alineación de las secuencias nucleotídicas del gen <i>mt-cyb</i> , mientras que el árbol superior se generó a partir de la traducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>mt-nd6</i> . Imagen tomada de Williams et al., 2011.	2
3. Esquema que representa la localización del periodo lábil en distintas especies, para el tratamiento efectivo con esteroides en la reversión sexual. Imagen obtenida de Piferrer, 2001.	7
4. Estrategias directa e indirecta para la feminización o masculinización de cultivos acuícolas. Imagen tomada de Piferrer, 2001.....	8
5. Tratamientos con alimento enriquecido con estadiol-17 β (natural) y 17 α etinilestradiol para la producción de hembras en varias especies de teleósteos. La línea discontinua es la regresión de la relación entre la dosis de estrógeno y la duración del tratamiento. Imagen tomada de Devlin y Nagahama, 2002.	¡Error! Marcador no definido.
6. Esquema representativo de la administración de la hormona en los tanques.	18
7. Mortalidad acumulada para cada tratamiento durante el periodo experimental de 195 dde. Control, tratamiento control; t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde.....	23
8. Gráfica de cajas y bigotes de la longitud patrón (LP) de las lobinas rayadas (<i>Morone saxatilis</i>) tratadas con 17 α -etinilestradiol (10 y 20 mg/kg en el alimento) y el control (0 mg/kg), a los 50 (color azul), 65 (color rojo) y 80 dde (color verde). Los puntos afuera de las cajas indican datos extremos.	24
9. Gráfica de cajas y bigotes del peso (P) de las lobinas rayadas (<i>Morone saxatilis</i>) tratadas con 17 α -etinilestradiol (10 y 20 mg/kg) y el control (0 mg/kg), a los 50 (color azul), 65 (color rojo) y 80 dde (color verde). Los puntos afuera de las cajas indican datos extremos.	25
10. Gráfica comparativa del promedio de alimento ingerido por pez (g) en cada periodo de administración de la hormona (30-50dde, 45-65 dde, 60-80, 75-101 dde) y de cada tratamiento experimental y del control. ctrl, tratamiento control; t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde.....	26

11. Ovario de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (12.27 ± 0.88 cm de longitud total) con ovogonias y ovocitos en distintos estadios de desarrollo. Lamela ovárica con un ovocito ($30.05 \mu\text{m}$) y la presencia de ovogonias ($\geq 10 \mu\text{m}$) en distintos estadios del desarrollo, magnificación 100X. A. Ovocito previtelogénico rodeado por las células foliculares (células de la granulosa y de la teca), magnificación 1000X. Ov: ovocito, Og: ovogonia, Cs: células foliculares, Nt: núcleo, Cp: citoplasma 27
12. Ovario de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (12 cm de longitud total). La cavidad ovárica se puede identificar en la región central del ovario. Se observan ovocitos y ovogonias en distintos estadios del desarrollo dentro de lamelas ováricas. Magnificación 200X Ov: ovocito, Og: ovogonia, Co: cavidad ovárica, Lo: lamela ovárica 27
13. Corte longitudinal de testículo de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (12.85 ± 0.87 cm de longitud total), se observan los lóbulos espermáticos con espermatogonias, magnificación 100X. A. Amplificación de un lóbulo espermático con una serie de espermatogonias, magnificación 1000X. Ls: lóbulo espermático, Es: espermatogonias..... 28
14. Corte longitudinal de una gónada intersexual de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (12.05 ± 0.06 cm de longitud total), con una región con tejido ovárico (extremo superior) y otra región con tejido testicular (extremo inferior), magnificación 40X. A. Detalle del tejido femenino, magnificación 100X. B. Detalle del tejido masculino, magnificación 100X. Ov: ovocito, Le: lóbulo espermático 28
15. Corte longitudinal de una gónada indiferenciada de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (15.1 cm de longitud total), la cual no presenta características para la identificación del sexo (100X). Histología por congelación 29
16. Corte longitudinal de ovario de lobina rayada *Morone saxatilis* de 195 dde (15.61 ± 1.22 cm de longitud total). Se puede observar un mayor número de ovocitos y en un estadio más avanzado del desarrollo de manera que ocupan la mayor parte del estroma ovárico, magnificación 100x. Ov: ovocito, Og: ovogonia, Eo: estroma ovárico..... 30
17. Corte longitudinal de testículo de lobina raya *Morone saxatilis* de 195 dde (15.73 ± 0.90 cm de longitud total). Corte histológico en el que se observan lóbulos espermáticos distribuidos en toda la gónada, magnificación 100X. A. Ampliación, en la que se observa con mayor detalle los lóbulos espermáticos y las espermatogonias, magnificación 400X. Ls: lóbulo espermático, Es: espermatogonia..... 31
18. Corte longitudinal de gónada intersexual de lobina raya *Morone saxatilis* de 195 dde (15.25 ± 2.47 cm de longitud total). A. Ampliación de la región de la gónada diferenciada en tejido ovárico, con la presencia de ovocitos de color morado intenso, magnificación 80X. B. Ampliación de la región de la gónada diferenciada en tejido testicular, magnificación 80X. Ov: ovocitos 31
19. Corte longitudinal de un posible testículo de lobina rayada *Morone saxatilis* de 130 dde (11.28 ± 0.8 cm de longitud total). Vista panorámica de testículo de lobina rayada, magnificación 100X. A. Ampliación de un extremo de testículo en el cual se observan espermatogonias en la periferia de la gónada, magnificación 1000X. Es: espermatogonias..... 33
20. Corte longitudinal de un ovario de lobina rayada *Morone saxatilis* de 130 dde (10.58 ± 0.76 cm de longitud total). Se puede observar la cavidad ovárica y ovogonias en el epitelio germinal que la limita. Co: cavidad ovárica, Og: ovogonia 33

21. Corte transversal de una larva de lobina rayada *Morone saxatilis* de 39 dde (2.34 ± 0.2 cm de longitud total). Gónada encontrada entre el intestino y la vejiga gaseosa, unida al peritoneo por los mesenterios (100X). A. Ampliación de la gónada donde se observa el mesenterio que une al peritoneo, el tejido somático, una célula germinal (400X). Cg: célula germinal, G: gónada, I: intestino, Ms: mesenterio, Vn: vejiga natatoria. 34
22. Corte transversal de una larva de lobina rayada *Morone saxatilis* de 60 dde (4.87 ± 0.6 cm de longitud total). La gónada se encuentra unida al peritoneo, entre el músculo de la pared abdominal y el intestino (100X). A. Ampliación de la gónada donde se observa una célula germinal (400X). Cg: célula germinal, G: gónada, Ma: musculo abdominal, P: peritoneo. 35
23. Corte transversal de una larva de lobina rayada *Morone saxatilis* de 75 dde (6.78 ± 0.8 cm de longitud total). Par de gónadas unidas al peritoneo (100X). A. Ampliación de la gónada, donde se observa la presencia de una célula germinal (400X). Cg: célula germinal, G: gónada, P: peritoneo 35
24. Corte transversal de larva de lobina rayada *Morone saxatilis* de 81 dde (7.31 ± 1.2 cm de longitud total). A. Gónada unida al peritoneo (100X). B. Ampliación de la gónada, con la presencia de varias células germinales (400X). c. Gónada con la presencia de cavidad ovárica, en la región central de la gónada. Cg: célula germinal, G: gónada, P: peritoneo, Co: cavidad ovárica. 36
25. Cortes longitudinales de las gónadas de lobina rayada *Morone saxatilis* al final del primer periodo de administración hormonal a los 50 dde, A. Gónada de ejemplar expuesto a 10 mg/kg de EE (29.49 ± 2.82 mm) y B. Gónada de ejemplar expuesto a 20 mg/kg de EE (29.98 ± 3.87 mm). C. Gónada del tratamiento control sin EE, de 48 dde (30.65 ± 4.28 mm). G: gónada, Cg: célula germinal. 37
26. Cortes transversales de las gónadas de lobina rayada *Morone saxatilis* al final del segundo periodo de administración hormonal a los 65 dde, A. Gónada de ejemplar expuesto a de 10 mg/kg de EE (42.57 ± 8.14 mm) y B. Gónada de ejemplar expuesto a 20 mg/kg de EE (44.72 ± 4.63 mm). C. Gónada del tratamiento control sin EE, de 66 dde (49.47 ± 61 mm). G: gónada, Cg: célula germinal. 37
27. Cortes transversales de las gónadas de lobina rayada *Morone saxatilis* al final del tercer periodo de administración hormonal de 80 dde (100x), A. Gónada de ejemplar expuesto a 10 mg/kg de EE (59.38 ± 4.72 mm) y B. Gónada de ejemplar expuesto a 20 mg/kg de EE (58.66 ± 5.35 mm). C. Gónada del tratamiento control sin EE, de 78 dde (60.6 ± 4.53 mm). 38
28. Cortes histológicos de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde. A. Región medular de testículo (13.2 cm de longitud total). B. Región medular de ovario (17 cm de longitud total). En ambos se ilustra una acumulación de células con los núcleos teñidos intensamente y de una forma circular (indicados con un círculo). Le: lóbulo espermático, Ov: ovocito, Cc, cumulo celular..... 38
29. Testículo de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (14.7 cm de longitud total), en el cual se distingue una gran cantidad de tejido conectivo entre los lóbulos espermáticos. Ti: tejido intersticial, Le: lóbulo espermático..... 39
30. Diagrama de cajas y bigotes en paralelo de la longitud patrón de la lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde, para cada tratamiento experimental. Las barras verticales expresan la desviación estándar. Tratamientos: t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65

- dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde..... 40
31. Diagrama de cajas y bigotes en paralelo del peso de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde, de cada tratamiento experimental. Las barras verticales expresan la desviación estándar. Tratamientos: t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde..... 40
32. Diagrama de cajas y bigotes en paralelo de las longitudes patrón de la lobina rayada *Morone saxatilis* de 195 dde, de cada tratamiento experimental. Las barras verticales expresan la desviación estándar. Tratamientos: t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde. 41
33. Diagrama de cajas y bigotes en paralelo de los pesos de lobina rayada *Morone saxatilis* de 195 dde, de cada tratamiento experimental. Las barras verticales expresan la desviación estándar. Tratamientos: t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde..... 41

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Tratamientos eficaces con estrógenos naturales o sintéticos para la inducción de hembras fenotípicas en peces teleósteos. Métodos de administración de la hormona; A: exposición de los peces a la hormona por medio del alimento, I: exposición de los peces por medio de inmersión en baños con la hormona. EE: 17 α -etinilestradiol, E: estradiol, DES: dietilestilbestrol, EBA: acetato de butirilo de estradiol. Tabla tomada de Devlin y Nagahama, 2002.....	11
2. Proporción sexual de la lobina rayada <i>Morone saxatilis</i> a los 156 dde, para cada periodo de exposición y para cada concentración de la hormona. Se muestra el número de lobinas y el porcentaje correspondiente de individuos de cada sexo.	29
3. Proporción sexual de la lobina rayada <i>Morone saxatilis</i> a los 195 dde, para cada periodo de exposición hormonal y concentración de 17 α -etinilestradiol (EE). Se indica el porcentaje de individuos de cada sexo por periodo de exposición y concentración de EE.....	32
4. Solución fijadora Davidson.....	59
5. Solución descalcificadora	60
6. Proceso de deshidratación en procesador de tejidos	61
7. Proceso de desparafinación de laminillas histológicas	62
8. Proceso de tinción con hematoxilina-eosina	63

Capítulo 1. Introducción

La lobina rayada (*Morone saxatilis*) es un pez nativo de las costas del Atlántico de Norte América. Se distribuye desde el río St. Lawrence en Canadá, hasta el río St. John's en Florida. También se pueden encontrar en los ríos Hudson, Cape Fear y el embalse de Santee-Cooper, La lobina rayada fue introducida en las costas del Pacífico, actualmente se distribuye entre San diego, EE. UU y Vancouver, Canadá (Andersen *et al.*, 2021; Smithsonian, s/f). Recientemente se cultiva en jaulas marinas en la isla de Todos Santos, Ensenada, Baja California, México (Figura 1).

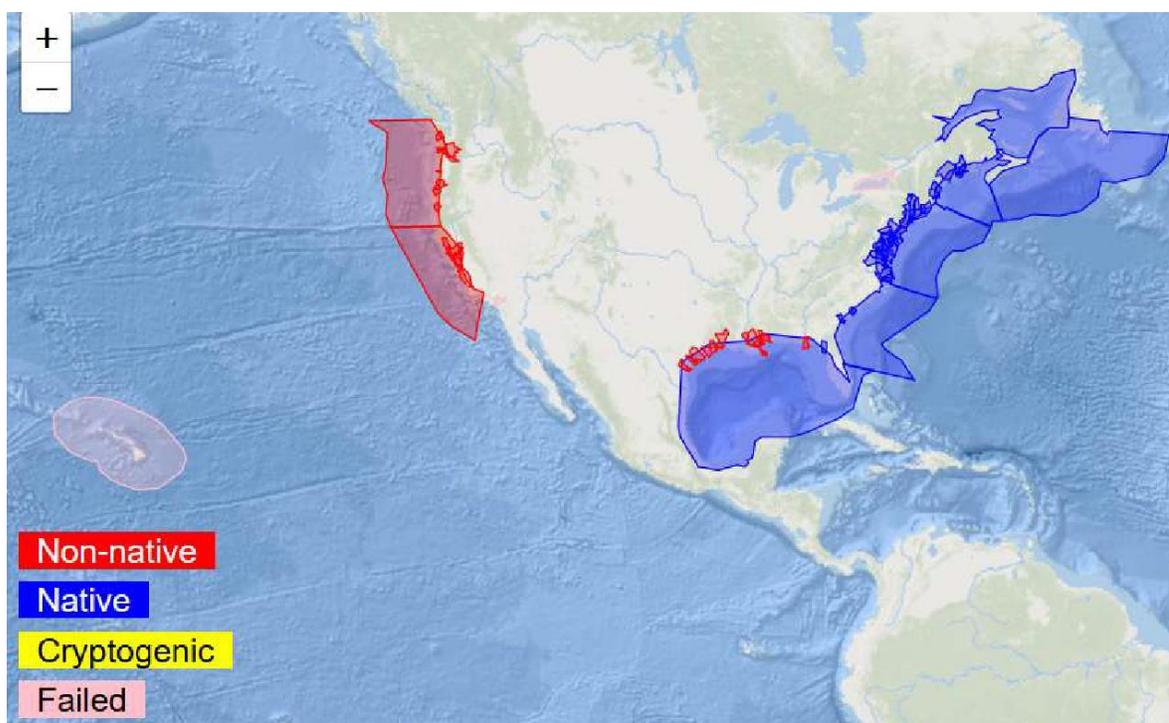


Figura 1. Distribución conocida de la lobina rayada: Atlántico occidental: río St. Lawrence en Quebec, Canadá hasta el lago Pontchartrain en Luisiana; al sur de Florida, EE. UU., hasta los desagües de los ríos St. Johns y Suwannee. Distribución en las costas del Pacífico: San Diego, Estados Unidos; hasta Vancouver, Canadá. Además de haber una introducción fallida en las costas Hawaianas. Imagen obtenida de Smithsonian. (s. f.).

Esta especie pertenece a la familia Moronidae, en la cual se encuentran dos géneros, *Morone* y *Dicentrarchus*. En el primero se incluyen a las lobinas rayadas (*Morone saxatilis*), blanca (*Morone chrysops*), amarilla (*Morone mississippiensis*) así como la perca blanca (*Morone americana*). En el género *Dicentrarchus* se incluyen a las lobinas europeas (*Dicentrarchus labrax*) y moteada (*Dicentrarchus punctatus*) (Figura 2). A pesar de pertenecer a géneros distintos, pero de la misma familia, el uso de la

información que se ha obtenido en estudios previos de la lobina europea puede servir de apoyo para el estudio de la lobina rayada, ya que la primera es una especie filogenéticamente muy cercana a *M. saxatilis* (Williams *et al.*, 2011) y cuyo cultivo tiene una larga historia, con el respaldo de un cúmulo importante de conocimientos científicos (FAO, s/f), inclusive en lo que se refiere a su reproducción (Piferrer *et al.*, 2005; Vandeputte *et al.*, 2020).

En la mayoría de las poblaciones de lobina rayada el desove, eclosión e incubación de huevos ocurre en agua dulce o ligeramente salobre, mientras que, los individuos juveniles y maduros se distribuyen con mayor frecuencia en ambientes marinos costeros y estuarinos (Setzler *et al.*, 1980; Andersen *et al.*, 2021).

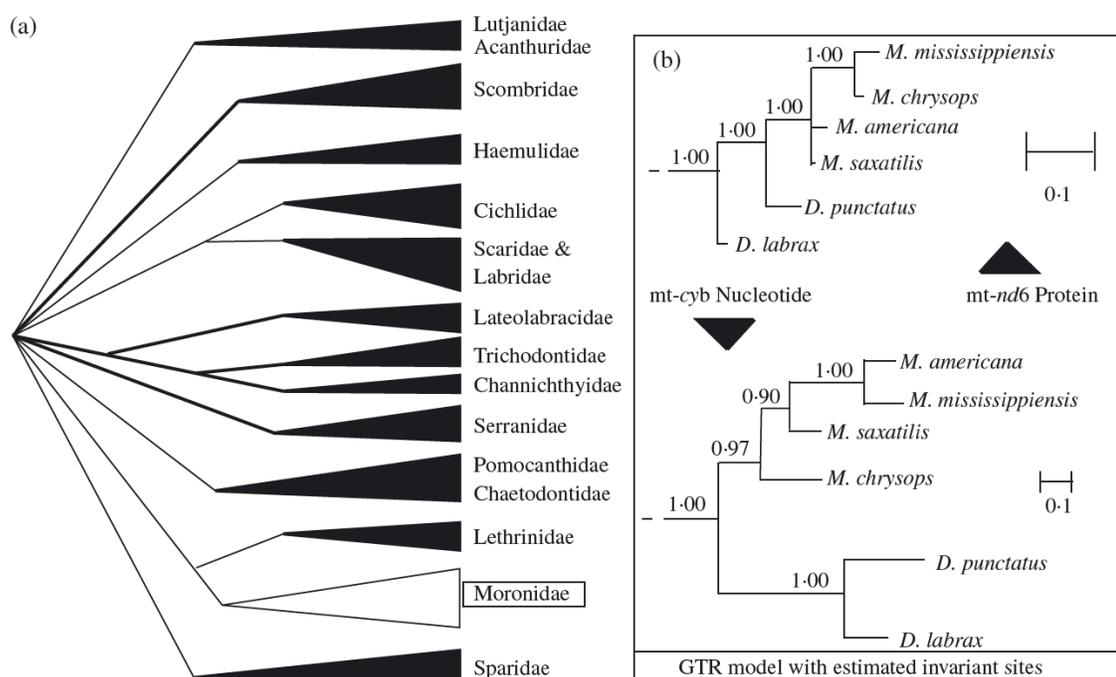


Figura 2. (a) Árbol consenso que muestra la estructura general de los Perciformes. (b) Filograma de los miembros de la familia Moronidae (incluidos los géneros *Morone* y *Dicentrarchus*). El árbol inferior se generó a partir de una alineación de las secuencias nucleotídicas del gen mt-cyb, mientras que el árbol superior se generó a partir de la traducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína mt-nd6. Imagen tomada de Williams *et al.*, 2011.

Muchas de las especies que comprenden a la familia *Moronidae* son de importancia comercial ya que son una fuente de alimento en distintas partes del mundo (Gajbhiye *et al.*, 2022). Dentro de esta familia, la lobina rayada se destaca como una especie de gran interés para la acuicultura debido a las siguientes características ventajosas: presenta un crecimiento rápido, se desarrolla inicialmente en sistemas de agua dulce, es apta para cultivo en jaulas marinas en mar abierto, y por la calidad de su carne es altamente valorada por los consumidores (Andersen *et al.*, 2021; Harrel, 1997).

El cultivo comercial de esta especie inició en 1970, con el objetivo de mejorar tanto el cultivo de peces como la pesca comercial y recreativa de las poblaciones nativas en la costa del Atlántico. En 1973, se produjeron los primeros híbridos de lobina rayada y lobina blanca (*Morone chrysops*), con la intención de generar un pez que tuviera la resistencia y la tolerancia ambiental de la lobina blanca y que pudiera crecer hasta el tamaño de una lobina rayada (Andersen *et al.*, 2021).

Actualmente, en México, la lobina rayada es cultivada por una sola granja comercial ubicada en Ensenada, Baja California: Pacífico Aquaculture. Esta empresa comenzó con el cultivo de atún en 2004 y en el 2010 inició con el cultivo de lobina rayada (Murillo-Nuñez, 2024). Una de las principales ventajas de esta especie, en comparación con la lobina híbrida, es que puede ser cultivada completamente en jaulas marinas, hasta alcanzar su tamaño comercial. Además, en etapas tempranas, las larvas se desarrollan en sistemas de recirculación con agua dulce antes de su aclimatación al agua salada (Harrell, 1997; Andersen *et al.*, 2021).

Se ha observado que las lobinas cultivadas en sistemas de recirculación pueden alcanzar un peso individual de 1.36 a 2.72 kg en aproximadamente 24 meses, lo cual no se ha conseguido en cultivos con la lobina híbrida (*M. saxatilis* X *M. chrysops*) (Andersen *et al.*, 2021). El valor por kg de este pescado en el mercado estadounidense oscila entre los 10 y 13.2 dólares, y su producción alcanzó un valor comercial de 16 millones de dólares en 2008, con un incremento a 23 millones de dólares en 2017 (Andersen *et al.*, 2021).

En muchas especies de peces, es frecuente que las hembras alcancen un mayor tamaño que los machos, lo que ha motivado un mayor interés por la producción de cultivos monosexuales de esta especie (Piferrer, 2001). Este enfoque también se utiliza como una estrategia para evitar la producción de machos precoces, que maduran sexualmente antes de los dos años, lo que limita el crecimiento de los peces y la productividad del cultivo (Hoga *et al.*, 2018).

1.1 Determinación sexual en peces

Durante el desarrollo sexual de los peces se presentan dos etapas clave: la determinación y la diferenciación sexual. La primera se define como la suma de todos aquellos procesos o cambios, ya sean genéticos o ambientales, que influyen sobre el desarrollo sexual del organismo. Mientras que, la segunda etapa se define como todos aquellos procesos por los cuales se expresa el fenotipo sexual del organismo, el cual ocurre, durante la etapa de determinación sexual. Ambos procesos son responsables por la presencia de hembras y de machos en la población de peces (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

La determinación sexual en peces se puede dar por distintos mecanismos, los cuales se pueden clasificar en genéticos o ambientales.

En la determinación genética, el sexo se define justo en el momento de la fertilización, y esta mediada por la presencia de un solo gen maestro que determina el sexo (monogénico), como lo sería el gen *SRY* en mamíferos o el gen *DMY* en medaka (*Oryzias latipes*), el cual existe únicamente en el genoma masculino y cuya mutación provoca que los machos se conviertan en hembras (Chen *et al*, 2022). También están los genes *amhy* en *Odontesthes hatcheri*, *GsdfY* en *Oryzias luzonensis*, *Amhr2* en *Takifugu rubripes* y *Dmrt1* en *Oreochromis* (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002; Kikuchi y Hamaguchi, 2013; Rajendiran *et al.*, 2021). La determinación también puede estar mediada por varios genes (poligénico), donde su acción acumulada ayuda a determinar el sexo. Estos genes se pueden encontrar dispersos en distintos cromosomas, o en un par en específico (gonosomas). En el caso de los gonosomas, la ausencia o las diferencias en la estructura de una de las cromátides hermanas puede determinar el sexo (sistemas heterogaméticos XX/XY u homogaméticos WW/WZ) (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

En la determinación ambiental, el sexo se define por la interacción entre el genoma del organismo y los factores ambientales como la temperatura, el pH, la salinidad, entre otros. En este caso el sexo es determinado durante el desarrollo del organismo, y dependiendo de la especie puede ocurrir primero en las hembras y posteriormente en los machos, o viceversa. También puede deberse a factores estresores o contaminantes, esta plasticidad del sistema de determinación sexual ha sido utilizada como una estrategia para la producción de cultivos monosexuales, siendo la aplicación de esteroides sexuales en el agua o en el alimento, la forma más común de este tipo de control del sexo (Devlin y Nagahama, 2002).

1.2 Diferenciación sexual en peces

La diferenciación sexual es aquel proceso que permite que la gónada indiferenciada se desarrolle en un testículo o en un ovario. Esto es controlado por distintos mecanismos moleculares y fisiológicos, que resultan en cambios de la morfología de la gónada, en el cual los procesos de diferenciación pueden ser alterados, ya sea por factores endógenos o exógenos, a este periodo se le conoce como periodo lábil (Piferrer, 2001).

Este proceso se puede dividir en dos etapas: la etapa 1, presenta gónadas indiferenciadas, que incluye la aparición de células germinales primordiales (PGC, por sus siglas en inglés), su migración a través del

cuerpo y su interacción en el epitelio celómico de las futuras crestas germinales. La etapa 2, son los cambios histológicos que terminan generando un ovario o un testículo (Piferrer, 2009).

En especies gonocoristas existen dos tipos de diferenciación sexual los cuales se pueden clasificar como gonocoristas diferenciados, donde la gónada indiferenciada se transforma de manera directa en un testículo o en un ovario, como ocurre en salmones, lobinas y rodaballo. También están los gonocoristas indiferenciados, en los cuales las gónadas indiferenciadas pasan por una etapa de diferenciación pseudo-ovárica y posteriormente se diferencia en un ovario o en un testículo, como ocurre en las anguilas y el pez cebra. A estas especies también se les conoce como falsos hermafroditas ya que no son capaces de cambiar de sexo cuando son adultos (Piferrer, 2009).

1.3 Antecedentes

1.3.1 Reproducción y ciclo de vida de la lobina rayada

Los machos de lobina rayada (*Morone saxatilis*) maduran sexualmente a los dos años, mientras que las hembras alcanzan la madurez sexual hasta los cuatro años. La época de reproducción de la especie ocurre de abril a junio, y desovan en ambientes dulceacuícolas o ligeramente salobres. Los desoves ocurren cerca de la superficie y de manera explosiva, son de corta duración y ocurren a temperaturas de 16-17°C. La fertilización de los huevos es externa como en muchas especies de peces, donde se ha llegado a ver que una hembra puede llegar a estar rodeada hasta por 50 machos (Setzler *et al.*, 1980).

Los huevos de la lobina rayada son esféricos, semiflotantes, no adhesivos y transparentes, con una gran gota de aceite. Se endurecen aproximadamente después de una a dos horas de la puesta. Presentan un diámetro de 1.3 a 1.6 mm, y la eclosión ocurre entre 29 horas (a una temperatura del agua de 22°C) y hasta 80 horas después de la fertilización y temperatura de 11°C (Setzler *et al.*, 1980).

Las larvas pueden llegar a medir 3.3 mm, no presentan boca y los ojos no están pigmentados, además, tiene un saco vitelino con una gran gota de aceite, el vitelo puede durar de 7 a 14 días después de la eclosión (Setzler *et al.*, 1980). Conforme se van desarrollando las larvas se convierten en juveniles, estos migran río abajo hasta llegar a la costa, donde permanecen durante su primer año de vida. Una vez

alcanzados los dos años, los peces se congregan en pequeños cardúmenes, que migran de norte a sur, a lo largo de la costa (Setzler *et al.*, 1980).

1.3.2 Métodos para el control de la reproducción y el sexo

En la acuicultura el control del sexo y la reproducción en un cultivo acuícola tiene distintos objetivos estratégicos. Entre ellos se encuentran la prevención de la maduración sexual precoz, evitar la reproducción descontrolada de los cultivos y la generación de poblaciones monosexuales. Estas últimas son relevantes debido a las diferencias en la tasa de crecimiento y el valor económico entre los sexos, la reducción del impacto del fenotípico sexual en la calidad del producto, el incremento de la estabilidad de los sistemas de apareamiento y como una estrategia para la protección ambiental y de la propiedad intelectual (especies no autóctonas o mejoradas genéticamente) (Budd *et al.*, 2015).

Para poder alcanzar los objetivos expuestos anteriormente, existen distintas técnicas que incluyen:

La producción de organismos poliploides. Esta técnica consiste en alterar el número cromosómico normal de los organismos mediante la generación de triploides o tetraploides. Esto se logra aplicando “shocks” físicos o químicos que interfieren en los procesos de gametogénesis y de postfecundación temprana. Esta técnica es muy usada para la generación de organismos estériles (triploidias) o de reproductores (tetraploidias) que son capaces de generar organismos estériles (Piferrer, 2001).

El uso de factores ambientales. Esta estrategia se basa en modificar condiciones como la temperatura, la salinidad, el pH o la densidad de organismos durante el cultivo, con el fin de influir en el proceso de diferenciación sexual. La manipulación ambiental permite ajustar el sexo de los peces sin necesidad de intervención directa en su genética o fisiología (Piferrer, 2001; Baroiler *et al.*, 2009).

La técnica de administración de compuestos exógenos. Esta técnica se basa en la exposición de los peces a compuestos exógenos que presentan actividad estrogénica o androgénica en el organismo. En esta técnica es común el uso de esteroides sexuales (hormonas sexuales) como el estradiol y la testosterona, suministradas a los organismos sexualmente indiferenciados como lo pueden ser larvas o juveniles (dependiendo de la especie). Las hormonas que se usan imitan los efectos de las hormonas sexuales endógenas redirigiendo el desarrollo de las gónadas hacia el sexo que normalmente produce el tipo de hormona administrada, ya sean hembras o machos (Piferrer, 2001).

1.3.3 Uso de esteroides sexuales en el cultivo de peces

Las hormonas son mensajeros químicos que se encargan de la comunicación entre células, y generan una serie de reacciones bioquímicas que conducen a respuestas biológicas específicas. Las hormonas sexuales son en su mayoría esteroides, compuestos producidos a partir del colesterol, algunas de las más conocidas son los estrógenos, andrógenos y progestágenos (Hoga *et al.*, 2018). Estas tienen como función el dirigir la diferenciación sexual en el organismo y son producidas por el mismo organismo de manera natural (hormonas endógenas). Sin embargo, las hormonas también pueden ser administradas al organismo de manera exógena, procedimiento que es usado en la acuicultura, para el control de la reproducción o la producción de cultivos monosexuales (Hoga *et al.*, 2018).

La aplicación de hormonas exógenas en los cultivos acuícolas se realiza mediante exposiciones breves durante las primeras etapas del período de diferenciación sexual de los peces, justo cuando el organismo es más susceptible a los efectos hormonales, resultando en alteraciones permanentes en el fenotipo sexual. A este periodo en el que un organismo es sensible a los esteroides se le conoce como periodo lábil, la duración y en la etapa del desarrollo en el que se encuentra puede variar dependiendo de la especie, como se muestra en la Figura 3 (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

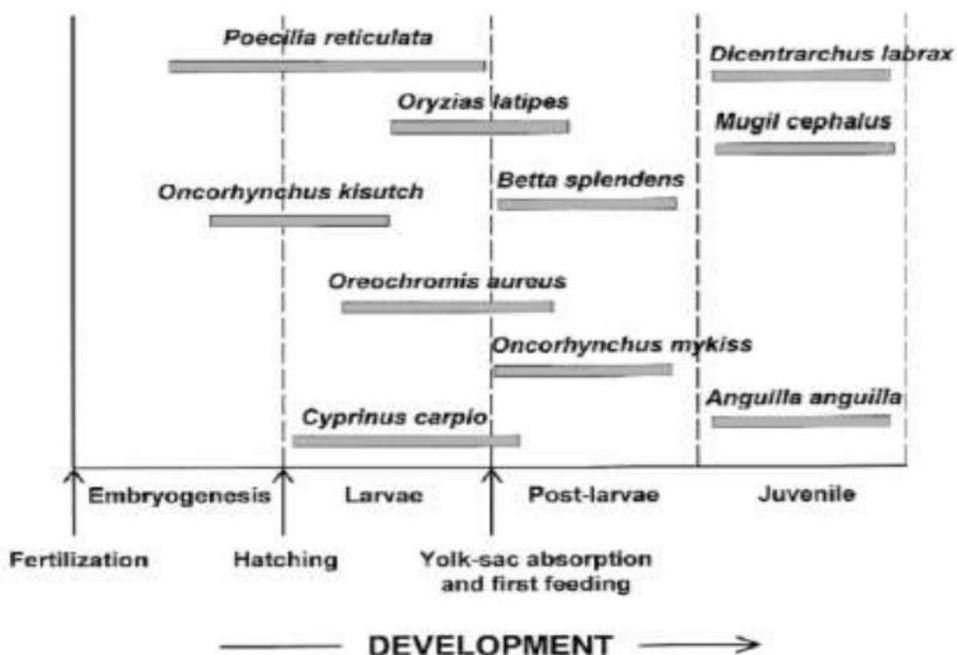


Figura 3. Esquema que representa la localización del periodo lábil en distintas especies, para el tratamiento efectivo con esteroides en la reversión sexual. Imagen obtenida de Piferrer, 2001.

La generación de cultivos monosexuales tiene por objetivo el producir cultivos donde las poblaciones sean del mismo sexo (generalmente hembras). También se aplica para privilegiar el desarrollo del sexo que tiene otros atributos, como lo pueden ser patrones de coloración o el tamaño de las aletas, que es una característica deseable en los peces ornamentales (Singh, 2013). También se ha aplicado esta estrategia para el control de la reproducción en cultivos como el de tilapia y evitar la reproducción descontrolada de los organismos, lo que afecta la calidad de agua y la densidad de cultivo (Piferrer, 2001).

Existen dos grandes estrategias para la feminización o masculinización de cultivos acuícolas, las cuales pueden ser directas o indirectas:

Los métodos directos, consisten en la administración de hormonas correspondientes al sexo que se quiere favorecer en el cultivo, como el uso de estradiol para la obtención de hembras, o el uso de testosterona para la obtención de machos. Esta técnica es efectiva en una sola generación y puede aplicarse a cualquier especie, independientemente del mecanismo de determinación del sexo (Piferrer, 2001).

Los métodos indirectos, requieren de varias generaciones y es mejor para aquellas especies que presentan determinación genética del sexo. Este método consiste en feminizar o masculinizar peces genéticamente machos o hembras y usar sus gametos para la producción de cultivos monosexuales (Figura 4).

A) Feminización directa



B) Feminización indirecta

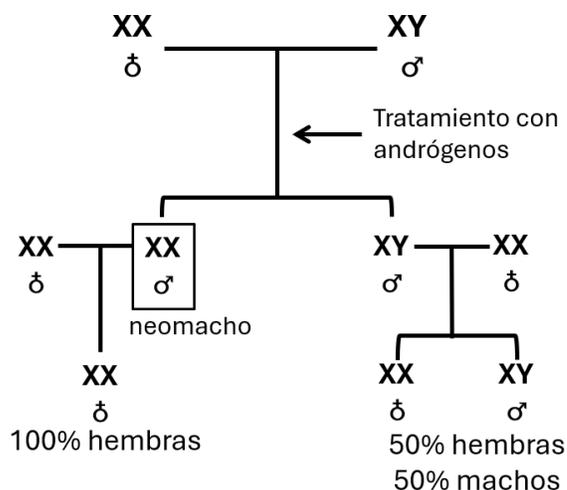


Figura 4. Estrategias directa e indirecta para la feminización o masculinización de cultivos acuícolas. Imagen tomada de Piferrer, 2001.

1.3.4 Vías de administración de hormonas exógenas

Una vez seleccionada la estrategia de feminización o masculinización de los organismos, existen tres técnicas para la administración de las hormonas sexuales (Piferrer, 2001)

Inyecciones intramusculares: consiste en la administración directa de la hormona mediante inyecciones intramusculares en los peces. Sin embargo, esta técnica se limita generalmente a un número reducido de organismos, ya que no es práctica para grandes poblaciones debido al tiempo y esfuerzo requeridos (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

Inmersiones en baños: Se colocan los organismos en estanques o recipientes con agua donde se ha disuelto la hormona. Esta técnica es recomendada para especies cuyo periodo lábil ocurre en las primeras etapas del desarrollo, antes de que los organismos sean capaces de alimentarse de manera exógena. Por ejemplo, en algunas especies de salmónidos, los huevos pueden ser expuestos a la hormona a través de esta técnica (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

Alimento enriquecido: En esta técnica, se asperja una solución hormonal sobre el alimento, permitiendo que la solución se evapore y deje el alimento impregnado con la hormona. Es ideal para especies cuyo periodo lábil ocurre en estadios avanzados del desarrollo, cuando los individuos ya son capaces de alimentarse. El éxito de este método depende de la cantidad de alimento consumido por los peces, y al igual que la técnica de inmersión, es adecuada para tratar grandes poblaciones al mismo tiempo (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

Las dosis eficaces de un tratamiento oral o por inmersión con hormonas son de aproximadamente 5 a 500 mg/kg de alimento o de 50 a 1000 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, aunque estas concentraciones pueden variar dependiendo de la especie y el estadio del desarrollo (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002) (Tabla 1 y Figura 5).

1.3.5 Tipos de hormonas exógenas

Los esteroides utilizados para el control del sexo pueden ser de origen natural o sintético, siendo estos últimos los más utilizados, debido a su precio relativamente económico y a su vida media prolongada en

el organismo. Una de estas hormonas es el 17α -etinilestradiol, que es un compuesto estrogénico derivado del estradiol (Devlin y Nagahama, 2002).

El 17α -etinilestradiol fue sintetizado por primera vez en 1983 por Hans Herloff Inhoffen y Walter Hohlweg, con el propósito de crear un estrógeno con una mayor biodisponibilidad oral. Esta propiedad se logró mediante la sustitución de un grupo etinilo en el carbono 17 del estradiol, lo que incrementó significativamente su estabilidad metabólica y eficacia (NCBI, 2023).

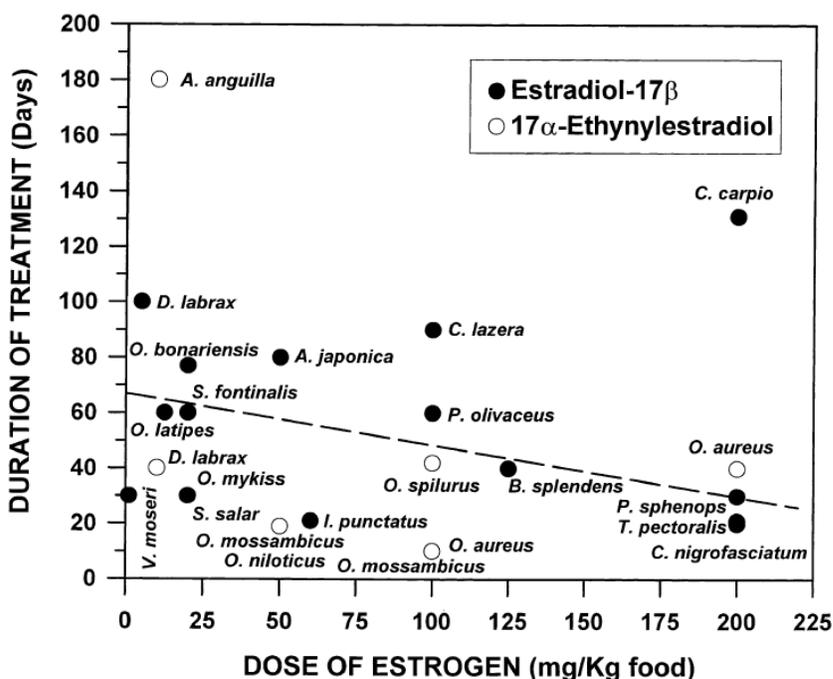


Figura 5. Tratamientos con alimento enriquecido con estradiol-17β (natural) y 17α etinilestradiol para la producción de hembras en varias especies de teleósteos. La línea discontinua es la regresión de la relación entre la dosis de estrógeno y la duración del tratamiento. Imagen tomada de Devlin y Nagahama, 2002.

1.4 Control del sexo en la lobina rayada

La biología reproductiva de la lobina rayada aún no se comprende completamente, lo que dificulta el conocimiento preciso del periodo lábil para controlar de forma eficaz la proporción sexual de sus progenies y, por ende, la generación de cultivos monosexuales de hembras.

Tabla 1. Tratamientos eficaces con estrógenos naturales o sintéticos para la inducción de hembras fenotípicas en peces teleósteos. Métodos de administración de la hormona; A: exposición de los peces a la hormona por medio del alimento, I: exposición de los peces por medio de inmersión en baños con la hormona. EE: 17 α -etinilestradiol, E: estradiol, DES: dietilestilbestrol, EBA: acetato de butirilo de estradiol. Tabla tomada de Devlin y Nagahama, 2002

Especie	administración	hormona	dosis	Timing	Duración	Porcentaje de hembras
<i>Dicentrarchus labrax</i>	A	EE	10 mg/kg	408-88 días después de la fertilización (ddf)	40 días	80%
		E	5 mg/kg	121-221 ddf	100 días	93%
<i>Anguila anguila</i>	A	EE	10 mg/kg	6-8 cm	6 meses	91%
		E	25 mg/kg	2-7 g	91 días	78%
<i>Salmo salar</i>	A	E	20 mg/kg	15-45 días después de la primera alimentación	30 días	100%
<i>O. kisutch</i>	I	E	400 μ g/L	4-6 dde	2 hr cada día	100%
<i>O masou</i>	I	E	0.5 μ g/L	5- 22 dde	17 días	100%
<i>Trichogaster pectoralis</i>	A	E	200 mg/kg	14 dde	21 días	100%
	I	DES	50 μ g/L			
<i>Hemihaplochromis multicolor</i>	I	EBA	250 μ g/L	14-16 dde	2 días	100%

Sin embargo, el conocimiento filogenético de las especies de la familia Moronidae, junto con el amplio entendimiento de la biología reproductiva de la lobina europea (*Dicentrarchus labrax*), una especie con estrecho parentesco, proporciona una base sólida para formular hipótesis y diseñar experimentos sobre el control del sexo en lobina rayada.

En el caso de la lobina europea, numerosos estudios han documentado detalladamente los procesos de determinación y diferenciación sexual, estableciendo que su periodo lábil ocurre entre los días 40 y 60 en la etapa juvenil (Vandeputte et al., 2020). Recientemente, se ha avanzado en el estudio de la diferenciación sexual de la lobina rayada, y se confirma que este proceso se desarrolla entre los 32 y 52 días después de la eclosión (dde), cuando los individuos tienen un tamaño aproximado de 2.0 a 4.9 cm (Murillo-Nuñez, 2024).

1.5 Gonadogénesis y morfología de las gónadas

1.5.1 Células germinales primordiales

En el desarrollo de las gónadas (ya sean testículos u ovarios) están involucrados dos tipos de células: las somáticas, derivadas del peritoneo durante el desarrollo temprano, y las células germinales, cuyo origen son las Células Germinales Primordiales (PGCs, por sus siglas en inglés), presentes tanto en los testículos como en los ovarios, y responsables de la generación de las ovogonias y espermatogonias. Las PGCs son fácilmente identificables en el tejido por su gran tamaño respecto a las células circundantes, además de presentar una forma ovalada con un núcleo redondo una alta relación núcleo-citoplasma y mitocondrias de gran tamaño cerca del núcleo, también contienen RNAs mensajeros (mRNA) esenciales para el desarrollo de células germinales (e.g. VASA) y proteínas específicas que definen su función y se utilizan como marcadores moleculares para su identificación (Devlin y Nagahama, 2002; Escudero, 2018).

El proceso de formación de las PGCs se puede clasificar en dos tipos dependiendo de su origen: preformista y epigenético. Las PGCs preformadas, son aquellas que reciben determinantes citoplasmáticos (proteínas citoplasmáticas y mRNAs) de origen materno, que regulan la diferenciación de las células embrionarias en PGCs, y ocurre en distintas especies de peces como el pez cebra (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*), bacalao (*Gadus morhua*), lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) y en la lobina rayada (*Morone saxatilis*). En contraste las PGCs de origen epigenético, se desarrollan o se diferencian en las crestas germinales y

surgen como resultado de señales inductivas generadas por los tejidos circundantes (tejido somático), y se presentan en la mayoría de los mamíferos (Extravour y Akam, 2003; Montes, 2014; Escudero, 2018).

Las PGCs, migran a través del mesenterio dorsal del intestino (tejido que envuelve a los intestinos y los conecta con la pared abdominal manteniéndolos en su lugar) hacia la región de las gónadas para formar el primordio gonadal, el cual posteriormente dará origen a la cresta gonadal que es un engrosamiento longitudinal del mesodermo en el techo de la cavidad abdominal en posición ventral respecto al riñón y lateral al mesenterio dorsal (Extravour y akam, 2003; Xu *et al.*, 2010; Montes, 2014; Escudero, 2018).

1.5.2 Desarrollo y morfología ovárica

Los ovarios son los órganos reproductores femeninos y están encargados de la producción de óvulos, estos órganos se encuentran sujetos por el mesovario a la pared de la vejiga gaseosa. Están cubiertos por la túnica albugínea, una delgada capa de tejido conectivo del que se originan las lamelas ováricas, que están constituidas por el epitelio germinal hacia el interior del ovario, y por el estroma ovárico dispuesto en el interior de las lamelas, este tejido contiene músculo liso y vasos sanguíneos, que está en contacto con el epitelio germinal y es donde se desarrollan los folículos ováricos (Montes, 2014; Cabrera Lozano, 2019).

El desarrollo de los ovarios es más temprano que el de los testículos debido a la proliferación de las PGCs. El primer indicio de desarrollo ovárico está dado por la aparición de la cavidad ovárica. Posteriormente las PGCs proliferan por procesos mitóticos y se diferencian en ovogonias. Posteriormente estas ovogonias inician la división meiótica, en la cual quedan detenidas en la primera fase de la división meiótica, al final de la profase en estado de diploteno, convirtiéndose un ovocito primario. Este ovocito primario es recubierto por una capa de células somáticas (células de la granulosa) y pasan al estroma donde son rodeadas por una segunda capa de células (células de la teca). Al conjunto de ovocito, células de la granulosa y de la teca, se le conoce como folículo ovárico. El ovocito primario queda parado en su división meiótica, y es en esta etapa en la cual el folículo crece y se acumulan mRNAs, además de producirse vitelogenina por el hígado, la cual es almacenada en el citoplasma del ovocito para ser usada como fuente de nutrientes para el futuro embrión. Posteriormente, el ovocito reanuda la meiosis hasta la formación del primer cuerpo polar, además aumenta de tamaño por el proceso de hidratación. Finalmente, el ovocito es expulsado del folículo hacia el lumen del ovario, para posteriormente ser fecundado (Lubzens *et al.*, 2010; Montes, 2014; Cabrera Lozano, 2019).

1.5.3 Desarrollo y morfología testicular

Los testículos son los órganos reproductores masculinos, están sostenidos de manera muy similar a los ovarios en la cavidad abdominal, por el mesorquio. Están constituidos por numerosos lóbulos testiculares que contiene los cistos espermáticos, en los que se encuentra una sola espermatogonia rodeada por células de Sertoli, y el tejido intersticial localizado entre los lóbulos testiculares, y que contiene fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos, y las células de Leydig (Montes, 2014; Cabrera Lozano, 2019).

Existen dos tipos de testículos, los lobulares que están constituidos por conductos ciegos que confluyen hacia la región central del órgano en los conductos deferentes. Los lóbulos testiculares están, separados por tejido conjuntivo, este tipo de testículo se puede encontrar en la mayoría de los peces. Los testículos tubulares, se anastomosan entre sí en la periferia y confluyen en el centro del órgano en los conductos deferentes (Cabrera Lozano, 2019).

El desarrollo de la gónada primigenia en un testículo comienza con la proliferación de células de Sertoli, encargadas de dirigir el desarrollo del testículo, y cuyo origen está en las células mesodérmicas alrededor de las PGCs. Posteriormente comienza la proliferación de espermatogonias por una serie de divisiones mitóticas, las cuales posteriormente detienen su división y comienza el desarrollo de los túbulos seminíferos. A continuación, las espermatogonias tienen una serie de divisiones mitóticas, generando dos tipos de espermatogonias. La espermatogonia A, encargada de renovar por mitosis la línea germinal de espermatogonias A y B, y las espermatogonias B, encargadas de diferenciarse en espermatozoides, mediante una serie de divisiones mitóticas y meióticas. El desarrollo de los espermatozoides continúa con una serie de cambios morfológicos como la formación del flagelo y reducción del citoplasma y la compactación del núcleo celular (Schulz *et al.*, 2010; Montes, 2014; Cabrera Lozano, 2019).

1.6 Justificación

Debido a la importancia económica que tiene el cultivo de la lobina rayada (*Morone saxatilis*) en Baja California, es relevante optimizar su productividad mediante el monocultivo de hembras, ya que estas alcanzan tamaños y pesos mayores que los machos, lo cual se verá reflejado en una mayor producción de carne y en mayores ganancias económicas. Sin embargo, se ha observado que en los cultivos de esta especie hay una mayor prevalencia de machos, que además de tener menores longitudes y pesos, también tienen una maduración sexual precoz, lo que reduce su crecimiento. Por lo anterior se ha propuesto el uso

de esteroides sexuales, en particular de 17α -etinilestradiol que es una hormona sintética con propiedades estrogénicas más estables y potentes para propiciar la generación mayoritaria de hembras en los cultivos.

1.7 Hipótesis

La exposición de lobina rayada (*Morone saxatilis*) a la hormona 17α -etinilestradiol a una concentración de 10 mg/kg de alimento, de los 30 a los 60 días después de la eclosión, inducirá una mayor proporción de hembras.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Identificar el periodo y concentración de 17α -etinilestradiol adecuado para producir la mayor proporción de hembras de lobina rayada entre los 30 y 80 dde (días después de la eclosión).

1.8.2 Objetivos específicos

- Identificar el periodo y duración óptima de administración de 17α -etinilestradiol para la producción de hembras.
- Identificar la concentración apropiada de 17α -etinilestradiol (10 y 20 mg/kg de EE en el alimento) para la producción de hembras.
- Conocer la proporción sexual de cada grupo de experimentación mediante la identificación histológica de las gónadas.
- Comparar el desarrollo gonadal de juveniles expuestos en diferentes periodos de administración del 17α -etinilestradiol.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo de lobina rayada (*Morone saxatilis*)

Un grupo de 2500 larvas de lobina rayada de 29 días después de la eclosión (dde) que se encontraban en agua dulce (5ppt), fueron donadas por la empresa Pacifico Aquaculture. Las larvas fueron transportadas mediante el uso de bolsas plásticas con oxígeno a presión, a las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en Ensenada, Baja California, México.

En el laboratorio, las larvas se distribuyeron en dos sistemas de cultivo con agua dulce, el primero ubicado en el laboratorio de peces marinos (sistema experimental) y el segundo en el laboratorio húmedo en el edificio de acuicultura (sistema control).

El sistema experimental contó con 18 estanques con un volumen de 175 L cada uno, con una temperatura constante del agua de 23°C, mediante el uso de una bomba de calor/frío (marca Trane). En este sistema se realizó la exposición de las larvas a la hormona (17 α -etinilestradiol) en concentraciones de 10 y 20 mg por kg de alimento. Al inicio de la fase experimental, debido al tamaño de las larvas y a la densidad de cultivo, se redujo el volumen de agua de los estanques. Posteriormente a los 80 dde, el volumen se incrementó y se mantuvo hasta el final del experimento.

Para recolectar el agua residual de los estanques en los que se suministró el alimento enriquecido con la hormona, se dispuso de una tubería para recolectar el agua y conducirla a un estanque de 350 L en el que se le dio un tratamiento con ozono antes de verter al drenaje con la ayuda de una bomba sumergible. En los estanques que recibieron tratamientos con la hormona, se bloqueó el desagüe central que conducía el agua al sistema de recirculación y se colocó un desagüe externo en forma de W que desembocaba en la tubería de recolección de agua residual.

El sistema control, contaba con tres estanques de 120 L, la temperatura del agua se mantuvo constante de 23°C, mediante el uso de calentadores de titanio de 800 W. Al igual que en el sistema experimental al inicio del ensayo se redujo el volumen de los estanques a 40 L y posteriormente se incrementó a 120 L. En este sistema en ningún momento se suministró alimento con la hormona.

A los 107 dde debido al rápido crecimiento de los peces y a la alta densidad en los estanques del sistema control, se tomó la decisión de transferir los peces del laboratorio húmedo, a un sistema ubicado en el laboratorio de peces marinos. El nuevo sistema contaba con un estanque de 9000 L, cada réplica se mantuvo mediante el uso de jaulas de 1m cúbico, la temperatura se mantuvo a 23°C mediante el uso de un intercambiador de calor (marca trane).

Al inicio del experimento las larvas de lobina rayada se mantuvieron en agua dulce y a partir de los 35 dde se fue aumentando en 5 ppt la salinidad del agua cada día hasta llegara a 35 ppt, mediante la inyección de agua salada en los tanques de compensación de ambos sistemas.

Al inicio del experimento ambos sistemas funcionaron como sistemas de recirculación, flujo cerrado y con un recambio mínimo de agua, sin embargo, debido a la falta de maduración del biofiltro del sistema experimental y de control, ambos sistemas se cambiaron a flujo abierto (entrada y salida constante de agua) con la intención de mantener los parámetros de calidad de agua.

Se midieron las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT) y de nitritos (NO₂) mediante el uso de kits comerciales (API®). Diariamente se realizó la limpieza de los estanques mediante el uso de un sifón para extraer las heces y el alimento no consumido por los peces, del fondo de los estanques.

2.2 Administración de la hormona en el alimento

El alimento utilizado en el experimento fue donado por la empresa Pacifico Aquaculture S.A.P.I de C.V. La hormona sintética 17 α -etinilestradiol (de la marca Sigma-Aldrich, E4876), se administró en el alimento de la marca Ewos Pacífico Terra Summer (43 % de proteína y 16 % de lípidos) en dos concentraciones de 10 y 20 mg/kg de alimento.

Ambas concentraciones se suministraron en tres periodos distintos del desarrollo de los organismos, cada uno con una duración de 20 días con un traslape de cinco días entre periodos. El primer periodo comprendió de los 30 a los 50 dde, el segundo de los 45 a los 65 dde y el tercero de los 60 a los 80 dde. Cada periodo de administración hormonal se realizó por triplicado en distintos estanques de cultivo, como se indica en la Figura 6.

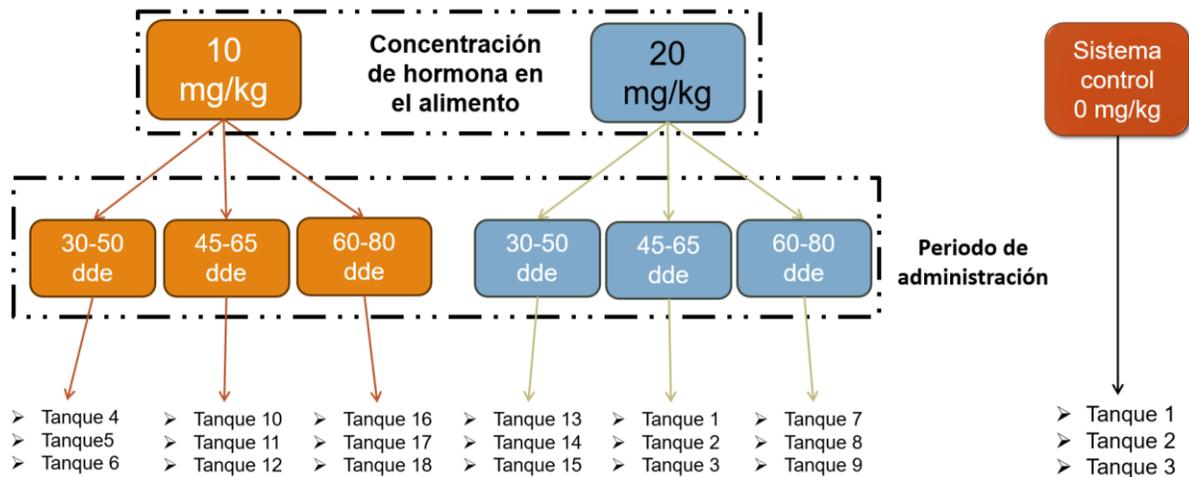


Figura 6. Esquema representativo de la administración de la hormona en los tanques.

Para el enriquecimiento del alimento con la hormona, se pesó la cantidad de la hormona necesaria para la cantidad de alimento que se quería suministrar a los peces. A continuación, la hormona se disolvió en alcohol etílico al 96%. Esta solución se asperjó sobre el alimento con la ayuda de una bureta. Durante este proceso se aseguró la mezcla continua del alimento con un vortex para lograr una distribución homogénea de la solución. Posteriormente, se evaporó el alcohol en una campana de extracción para eliminar el alcohol del alimento. En el caso de la dieta control se asperjó con alcohol al 96% sin hormona.

2.3 Alimentación de los organismos

En ambos sistemas (experimental y control) se suministró alimento dos veces al día, la primera ración a las 9:00 am y la segunda a las 15:00 horas. La alimentación de las larvas inició con un alimento de 0.5 mm de diámetro y a medida que los peces crecieron, se incrementó el diámetro del alimento hasta llegar a 3 mm. Diariamente se registró la cantidad de alimento suministrado por estanque para calcular el alimento consumido por los peces.

2.4 Descripción del proceso de desarrollo gonadal

Para la descripción del desarrollo gonadal de los peces, durante el periodo de los 30 a los 81 dde, cada tercer día se tomaron 3 organismos solo de los estanques control (N=162, número total de organismos muestreados) y se fijaron en solución Davidson (anexo A). Todos los organismos muestreados fueron

previamente anestesiados con 3 a 4 g por litro de metasulfanato de triclaína. De cada organismo se tomó la longitud total y longitud patrón, mediante el uso de un ictiómetro y el peso mediante el uso de una báscula (marca A&D medical). A las muestras de los 66 a los 81 dde se les disecó la vejiga natatoria junto con las gónadas, y para las muestras de los 30 a los 63 dde se disecó la región abdominal haciendo un corte detrás de la cabeza y otro detrás del ano. Los tejidos disecados se procesaron por histología en parafina, se cortaron secciones de 5 μm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Con la ayuda de un microscopio Olympus CX31 equipado con una cámara infinity 2, se identificaron las gónadas y se comparó su grado de desarrollo con la clasificación previamente descrita por Murillo-Nuñez (2024).

2.5 Identificación y descripción de las alteraciones gonadales ocasionadas por la exposición a 17α -etinilestradiol

Para evaluar los efectos de la exposición a la hormona en las gónadas, se tomaron muestras de 9 peces por estanque (N=324) antes y después del periodo de administración de la hormona en el alimento (primer periodo 30-50 dde, segundo periodo 45-65 dde, tercer periodo 60-80 dde). A cada pez se les tomaron las medidas de longitud total, longitud patrón, peso y se fijaron en solución Davidson (anexo A). Posteriormente se disecó la vejiga natatoria junto con las gónadas (muestras de los 65 a los 80 dde) o se disecó la región abdominal (muestras de los 30, 45, 50 y 60 dde), para ser procesadas por histología en parafina y realizar cortes histológicos. El tejido gonadal de estos peces se comparó con el de los peces del tratamiento control, tomando en consideración la longitud patrón.

2.6 Biometrías para el monitoreo del estado de los organismos

Posterior a la fase experimental, en los días 72, 86 y 107 dde se realizó una biometría de los organismos experimentales y de control, en la cual se tomaron las medidas de longitud total y longitud patrón (con el uso de un ictiómetro), y el peso (con el uso de una báscula) de 15 peces por tanque (N=315). Con la finalidad de registrar el crecimiento y estado de salud de los peces.

2.7 Identificación y confirmación de las proporciones sexuales

Para la cuantificación de la proporción sexual, se realizó un primer muestreo a los 158 dde, en el que se tomaron 15 peces por tanque (N=270), estos se anestesiaron con triclaína y posteriormente se tomaron las medidas de longitud total y longitud patrón (con el uso de un ictiómetro), y el peso (con el uso de una báscula). De cada organismo muestreado se disecaron ambas gónadas, de las cuales una se colocó en un crio-cassette histológico con medio OCT (Optimal cutting temperature compound, por sus siglas en inglés) y se congeló en el momento con el uso de hielo seco. Las muestras congeladas se guardaron en un ultracongelador a -80°C y posteriormente se procesaron por histología de congelación (para la identificación rápida del sexo). La otra gónada se colocó en un cassette histológico y se fijó con solución Davidson y posteriormente, se siguió el proceso descrito en la sección 2.4 para la confirmación del sexo de aquellas muestras que por histología por congelación no fuera posible la identificación del sexo.

Para confirmar las proporciones sexuales identificadas a los 158 dde, se tomó una segunda muestra a los 195 dde. Se muestrearon todos los estanques siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, con la diferencia de que el tamaño de la muestra fue de 5 peces por tanque (N=90), y que las gónadas procesadas por histología en parafina se fijaron con formol amortiguado con fosfatos.

2.8 Procesamiento de muestras histológicas

2.8.1 Histología en parafina

Para el procesamiento de las muestras por medio de histología en parafina, las muestras se fijaron en solución Davidson (o formol amortiguado con fosfatos), por un mínimo de tres días. Posteriormente las muestras ya fijadas se colocaron en cassettes histológicos, y se lavaron con alcohol etílico a una concentración del 70 % por 24 hr. Dependiendo del tipo de muestra esta se descalcificó mediante el uso de un baño de ácido nítrico (anexo B) con una duración de una a cuatro horas, dependiendo del tamaño de la muestra. A continuación, las muestras se colocaron en un procesador automático de tejidos (Leica, modelo TP1020), en el cual se sometieron a una serie de baños para la deshidratación del tejido. El proceso comenzó con una serie de baños de alcohol con una concentración creciente. Posteriormente se clarificaron con benceno y finalmente se bañaron en parafina (anexo C).

Al finalizar el proceso de deshidratación, se procedió a la inclusión de las muestras en moldes con parafina mediante el uso de un equipo de inclusión automático de tejidos (Leica, modelo EG1160). Una vez que se tenían las muestras incluidas en parafina, se realizaron los cortes seriados de tejidos con un grosor de 5 μm mediante un microtomo (Leica, modelo RM 2235). Los cortes se colocaron en un portaobjetos y para remover el exceso de parafina se colocaron en una estufa (Precision Scientific Co, modelo 4) a 65 °C (anexo D); posteriormente los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina (anexo E) y finalmente se montaron con resina.

2.8.2 Histología por congelación

Para el procesamiento histológico por congelación, las muestras se colocaron en un crio-cassette junto con medio de inclusión OCT y se congelaron en el momento con hielo seco, o de manera directa sin el uso de OCT para las muestras del día 195 dde.

Las muestras congeladas, se almacenaron en un ultracongelador a -80°C, para posteriormente realizar cortes histológicos con la ayuda de un criostato (Leica, CM1510 S). Los cortes se recolectaron en portaobjetos, los cuales se colocaron sobre una plancha de calentamiento (Premiere, XH2001) a 37°C para la fijación de la muestra al portaobjetos, y posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina (anexo E), y se montaron con resina.

2.9 Análisis estadístico

2.9.1 Análisis de la proporción sexual

A partir de las frecuencias registradas de cada sexo para los muestreos de los días 156 y 195 dde, se hizo un análisis de chi cuadrada con tablas de contingencia. Este análisis se realizó en tres dimensiones (considerando la concentración de la hormona, el periodo de exposición hormonal y la frecuencia de cada sexo), aplicando el criterio de independencia mutua y parcial. Con el objetivo de observar específicamente la asociación entre los factores, también se hizo este análisis en dos dimensiones (considerando la combinación de solo dos de los tres factores que se usaron en el análisis de tres dimensiones). Los análisis se realizaron a un nivel de confianza de un 95%.

2.9.2 Análisis de la relación del sexo con la longitud patrón y el peso

Se evaluó el efecto del periodo de exposición y la concentración de 17α -etinilestradiol, sobre las variables de longitud patrón y el peso de los organismos, entre los sexos de un mismo tratamiento y entre los tratamientos.

Se evaluó el supuesto de normalidad y homocedasticidad de los datos, mediante prueba de Shapiro-Wilk y una prueba de Levene. Al cumplir con los supuestos de los datos, se procedió a la realización de un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), junto con una prueba posthoc de Tukey ($p > 0.05$). Los datos que no cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedasticidad se transformaron con el uso de logaritmo y nuevamente se verificaron los supuestos. Todas las pruebas estadísticas y transformación de los datos se hicieron con el programa SPSS statistics de IBM, versión 25.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Cultivo de lobina rayada

La variación de la temperatura promedio a lo largo del cultivo fue de 23 ± 1.0 °C. La concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT) y de nitritos (NO_2) se mantuvo en 0.0 mg/L. Estos valores fueron el resultado del proceso de recirculación del agua y del recambio constante de agua en ambos sistemas.

Al inicio del experimento ambos sistemas contaron con un recambio mínimo de agua (sistema cerrado), sin embargo, debido al incipiente grado de maduración del biofiltro del sistema experimental, entre los días 36 y 40 dde, se observó una disminución en la calidad de agua (NAT: 1 mg/L y NO_2 : 5 mg/L), lo que resultó en las muertes de 55 peces (Figura 7). En el sistema control, del día 55 al 58 dde (Figura 7), se observó un incremento en el número de muertes (31 peces muertos), debido a una disminución en la calidad de agua (NAT: 2 a 4 mg/L y NO_2 : 1 a 5 mg/L) causado por que el biofiltro se vio excedido en su capacidad de remoción de nitrógeno.

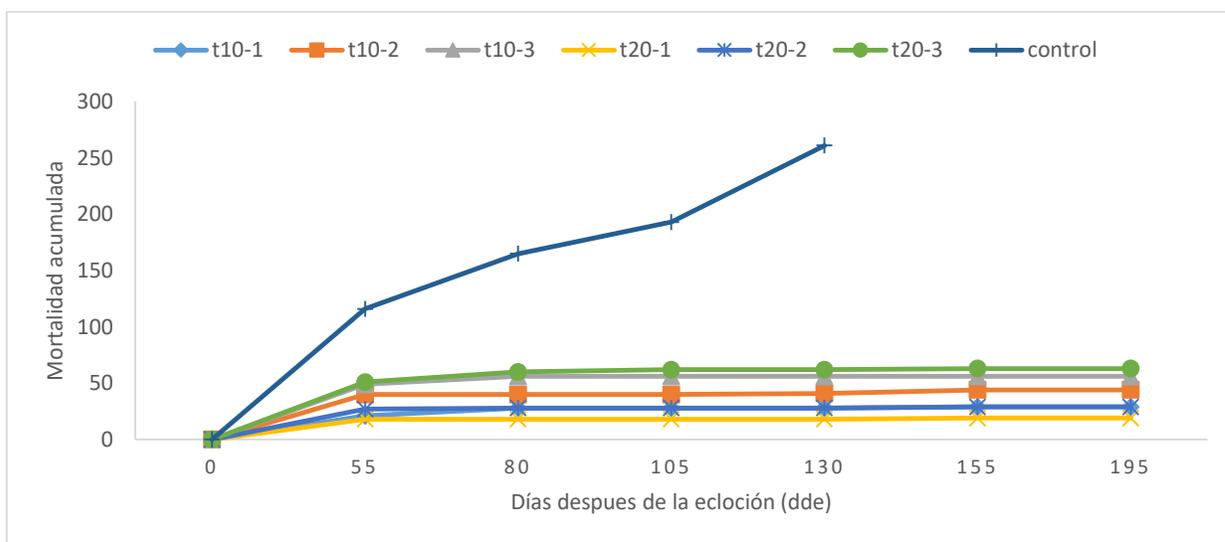


Figura 7. Mortalidad acumulada para cada tratamiento durante el periodo experimental de 195 dde. Control, tratamiento control; t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde

Durante el cultivo se registró la muerte de algunos peces, cuyos signos incluyeron alteraciones en la aleta dorsal, pectoral y caudal. Es posible que estas lesiones estuvieran asociadas con conductas de agresión y

canibalismo, debido a la voracidad de los peces y a la densidad de cultivo. Esta conducta se observó tanto en los peces del sistema control como en los experimentales, sin embargo, en el caso de los experimentales fue menor la agresión entre los peces.

La supervivencia de las larvas en los tratamientos experimentales en la concentración de 10 mg/kg de EE en el alimento y expuestas durante los 30 a 50 dde fue de 92.05 %, a los 45 a 65 dde fue de 90.85 % y a los 60 a 80 dde fue de 84.3 %. Mientras que en los organismos expuestos a 20 mg/kg de EE durante los 30 a 50 dde fue 95.77 %, a los 45 a 65 dde fue de 93.29 % y a los 60 a 80 dde fue de 82.22 %. En el caso de los tratamientos control la supervivencia fue de 50.31 %.

A los 126 y 128 dde, se observó la muerte de todos los organismos del sistema control (Figura 7), los cuales presentaban signos de muerte por falta de oxígeno en el agua (opérculos completamente abiertos y branquias pálidas), se tomaron algunos de los peces muertos, se realizaron frotis de las branquias y se identificó la presencia de *Amyloodinium* sp. Este parásito se adhiere al epitelio branquial, obstruyendo el intercambio de gases, lo que ocasiona una deficiencia en la oxigenación de los peces.

3.2 Efectos de la alimentación enriquecida con 17 α -etinilestradiol

Durante la administración del alimento enriquecido con la hormona, en los respectivos periodos de administración (30-50 dde, 45-65 dde y 60-80 dde), se observó en los peces un menor consumo del alimento, lo cual se vio reflejado en el crecimiento y en el alimento consumido por pez.

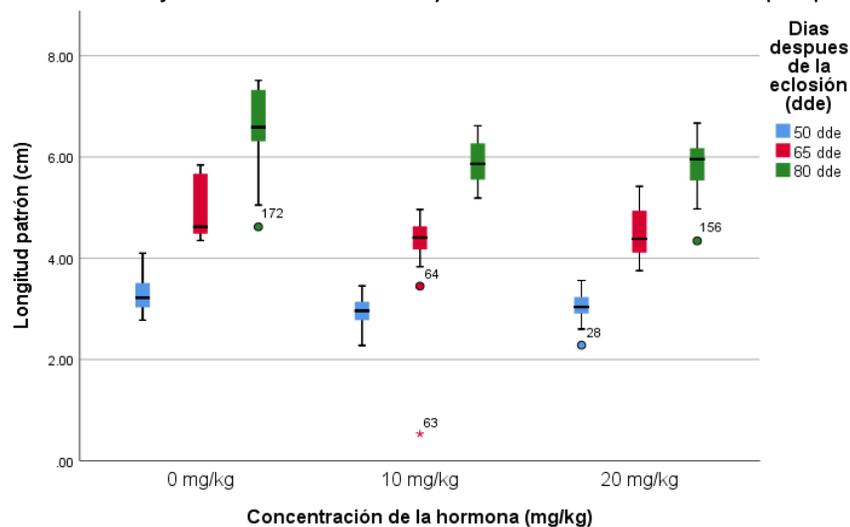


Figura 8. Gráfica de cajas y bigotes de la longitud patrón (LP) de las lobinas rayadas (*Morone saxatilis*) tratadas con 17 α -etinilestradiol (10 y 20 mg/kg en el alimento) y el control (0 mg/kg), a los 50 (color azul), 65 (color rojo) y 80 dde (color verde). Los puntos afuera de las cajas indican datos extremos.

El análisis de la longitud patrón indicó que las lobinas del tratamiento control (0 mg/kg, sin hormona) a los 80 dde crecieron más (6.51 ± 1.04 cm), aunque también se registró una mayor dispersión de las longitudes, en comparación con las lobinas de los tratamientos hormonados (10 mg/kg: 5.93 ± 0.47 cm; 20 mg/kg: 5.86 ± 0.53 cm) a los 80 dde (Figura 8). No se encontraron diferencias significativas en la longitud patrón entre los peces en los distintos tratamientos, pero sí entre las distintas edades.

El peso de las lobinas del tratamiento control (0 mg/kg) a los 80 dde fue mayor (6.51 ± 1.04 g), en comparación con las longitudes de los tratamientos hormonados (10 mg/kg: 4.54 ± 1.35 g; 20 mg/kg: 4.23 ± 1.13 g), a los 80 dde (Figura 9). No se encontraron diferencias significativas de la longitud patrón entre los distintos tratamientos, pero sí entre las distintas edades de los peces entre tratamientos

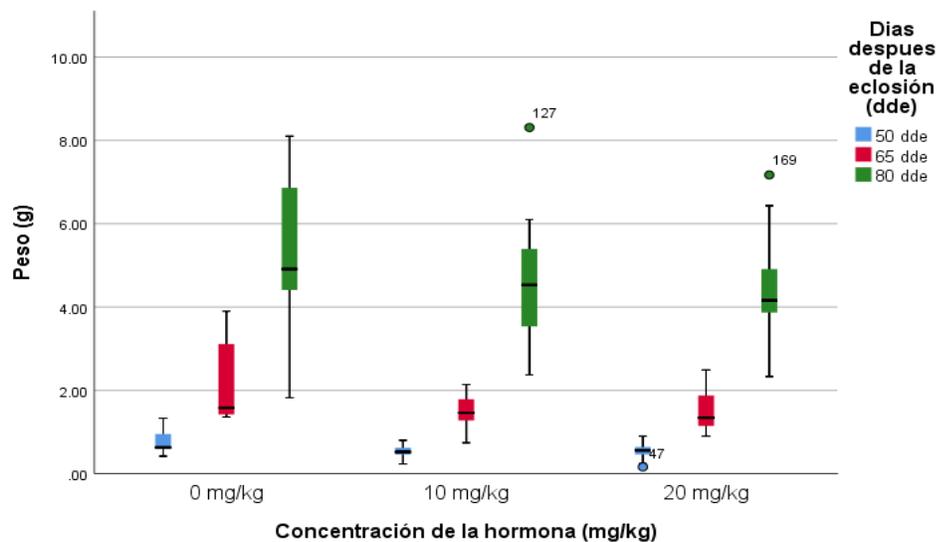


Figura 9. Gráfica de cajas y bigotes del peso (P) de las lobinas rayadas (*Morone saxatilis*) tratadas con 17α -etinilestradiol (10 y 20 mg/kg) y el control (0 mg/kg), a los 50 (color azul), 65 (color rojo) y 80 dde (color verde). Los puntos afuera de las cajas indican datos extremos.

En relación con el alimento consumido por pez, éste se calculó una vez concluido el periodo de exposición a la hormona, ya que las lobinas mostraron una mayor atracción por el alimento, lo que se vio reflejado en la cantidad de alimento consumido.

Como se puede observar en la Figura 10, la cantidad de alimento consumido por pez aumentó de forma gradual en los tratamientos expuestos a la hormona, así como en el tratamiento control. Sin embargo, en los tratamientos expuestos a la hormona entre los 60 a 80 dde (tratamientos t10-3 y t20-3), se presentó un mayor consumo de alimento por pez, entre los días 45 a 80 dde, en comparación con el resto de los tratamientos. Posteriormente en el periodo de 75 a 101 dde, el consumo de alimento en estos

tratamientos (t10-3 y t20-3) alcanzó valores similares al resto de tratamientos (en el periodo de 75 a 101 dde).

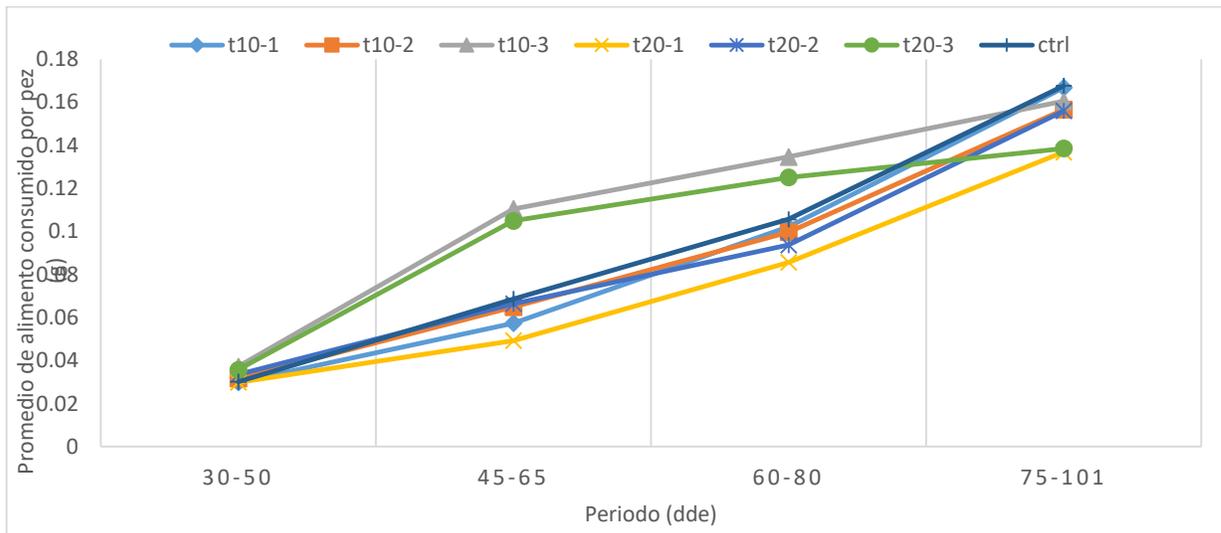


Figura 10. Gráfica comparativa del promedio de alimento ingerido por pez (g) en cada periodo de administración de la hormona (30-50dde, 45-65 dde, 60-80, 75-101 dde) y de cada tratamiento experimental y del control. ctrl, tratamiento control; t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde

3.3 Identificación del sexo y la proporción sexual

3.3.1 Muestreo en el día 156 dde

De las 270 gónadas extraídas y procesadas por histología por congelación, se realizaron cortes histológicos seriados de cinco ejemplares de cada estanque, por lo que se trabajó con 90 muestras en total.

En las gónadas analizadas no se observaron signos de madurez, sin embargo, tenían características suficientes para la identificación del sexo.

En las hembras, se observó la presencia de ovocitos y de ovogonias. Los ovocitos eran fácilmente identificables por su tamaño ($\geq 20 \mu\text{m}$ de diámetro) y forma circular u ovalada, con un núcleo que ocupa gran parte de la célula y con un citoplasma teñido de color lila (debido a la eosina). Las ovogonias presentaban una morfología similar a la de los ovocitos, aunque su diámetro fue menor a $10 \mu\text{m}$, como se puede observar en la Figura 11.

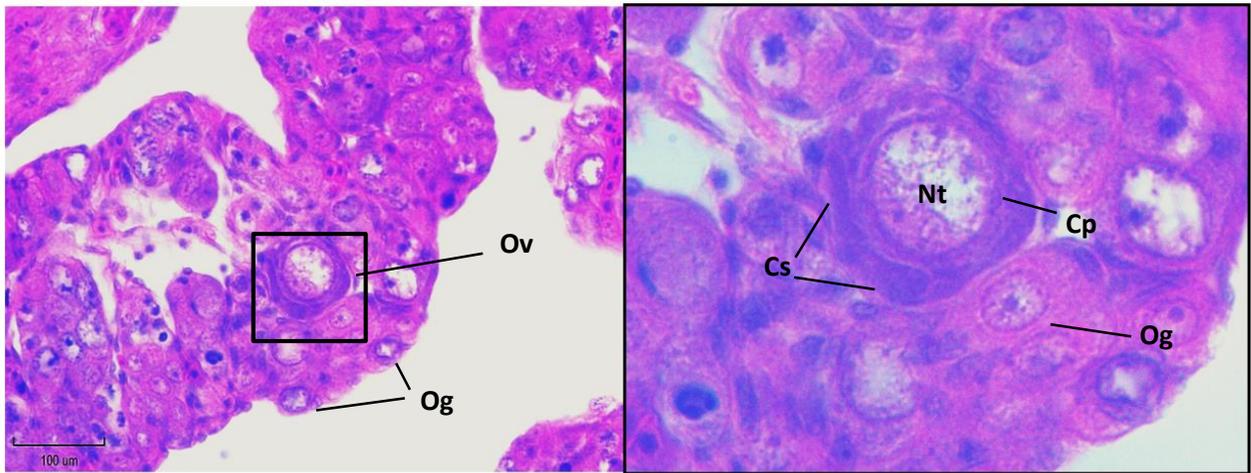


Figura 11. Ovario de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (12.27 ± 0.88 cm de longitud total) con ovogonias y ovocitos en distintos estadios de desarrollo. Lamela ovárica con un ovocito ($30.05 \mu\text{m}$) y la presencia de ovogonias ($\geq 10 \mu\text{m}$) en distintos estadios del desarrollo, magnificación 100X. A. Ovocito previtelogénico rodeado por las células foliculares (células de la granulosa y de la teca), magnificación 1000X. Ov: ovocito, Og: ovogonia, Cs: células foliculares, Nt: núcleo, Cp: citoplasma

La estructura interna del ovario se caracteriza por la presencia de lamelas ováricas y de una cavidad ovárica. Las primeras se pueden identificar por el epitelio germinal que delimita la cavidad ovárica y que se distingue como una delgada separación entre lamelas adyacentes, en el interior de cada lamela se encuentran las ovogonias y ovocitos. En la mayoría de las muestras, la cavidad ovárica se ubicó en el centro y a lo largo de la gónada, como se observa en la Figura 12.

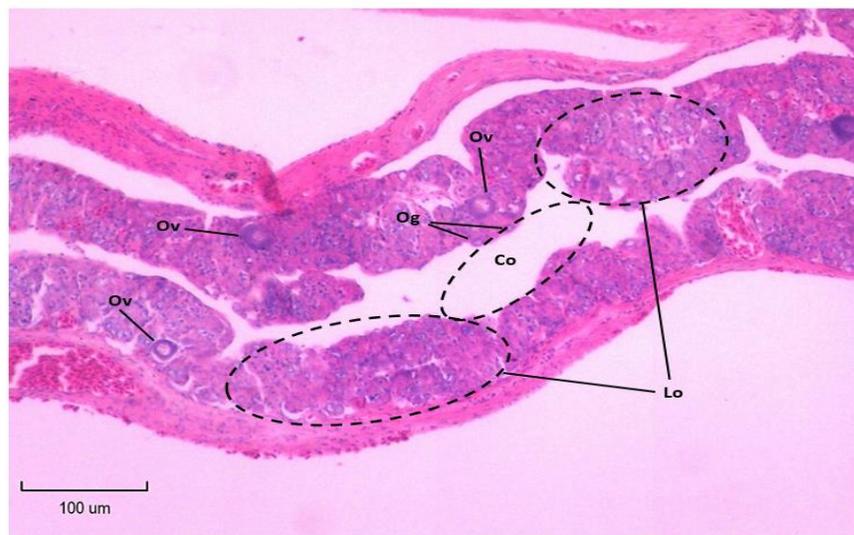


Figura 12. Ovario de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (12 cm de longitud total). La cavidad ovárica se puede identificar en la región central del ovario. Se observan ovocitos y ovogonias en distintos estadios del desarrollo dentro de lamelas ováricas. Magnificación 200X Ov: ovocito, Og: ovogonia, Co: cavidad ovárica, Lo: lamela ovárica

En los machos, los testículos se caracterizan por la presencia de espermatogonias que tiene un diámetro $\geq 10 \mu\text{m}$ y su forma es ovalada con un núcleo grande. Estas células se distribuyen a toda la gónada en los lóbulos espermáticos, que contienen hileras pareadas de espermatogonias (Figura 13).

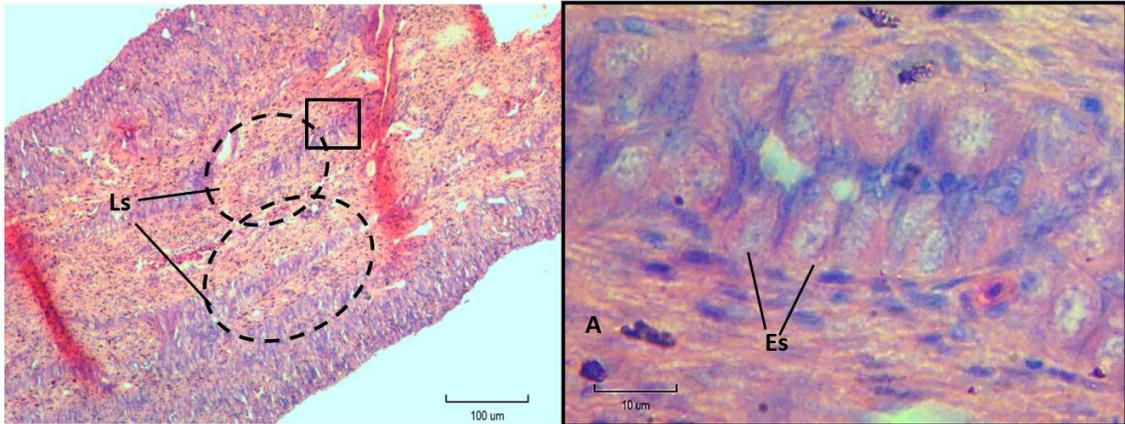


Figura 13. Corte longitudinal de testículo de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (12.85 ± 0.87 cm de longitud total), se observan los lóbulos espermáticos con espermatogonias, magnificación 100X. A. Amplificación de un lóbulo espermatógico con una serie de espermatogonias, magnificación 1000X. Ls: lóbulo espermatógico, Es: espermatogonias

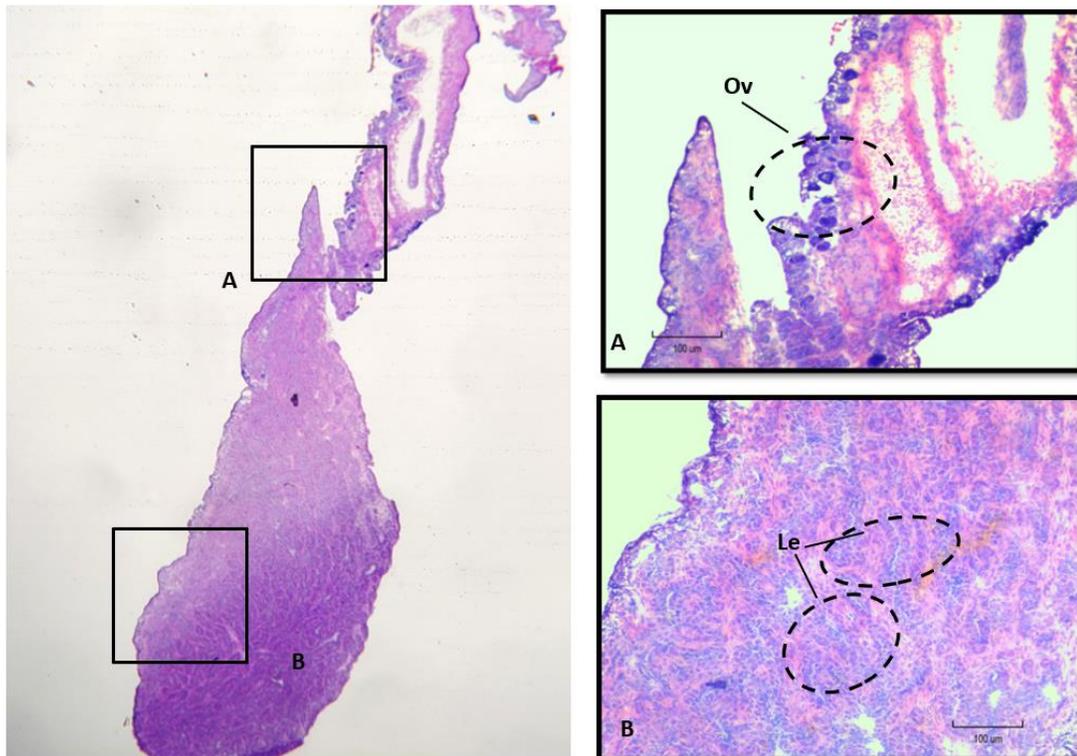


Figura 14. Corte longitudinal de una gónada intersexual de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (12.05 ± 0.06 cm de longitud total), con una región con tejido ovárico (extremo superior) y otra región con tejido testicular (extremo inferior), magnificación 40X. A. Detalle del tejido femenino, magnificación 100X. B. Detalle del tejido masculino, magnificación 100X. Ov: ovocito, Le: lóbulo espermatógico

Además de la identificación de hembras y machos, también se observaron gónadas intersexuales y gónadas indiferenciadas. Las primeras identificables por la presencia de ovocitos y de lóbulos espermáticos, localizados en los extremos de la gónada (Figura 14).

Las gónadas indiferenciadas se caracterizaron por la falta de elementos característicos de un ovario o testículo en el tejido medular, que permitiera la identificación del sexo (Figura 15).

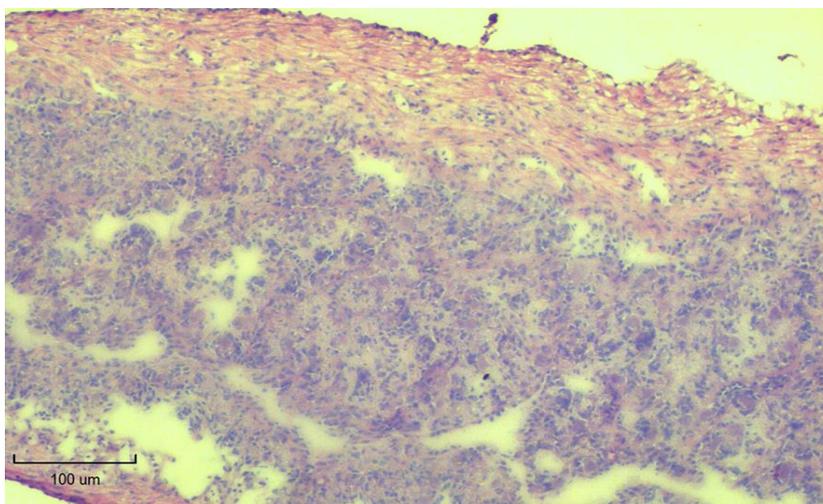


Figura 15. Corte longitudinal de una gónada indiferenciada de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (15.1 cm de longitud total), la cual no presenta características para la identificación del sexo (100X). Histología por congelación

3.3.1.1 Descripción de la proporción sexual a los 156 dde

A partir de la identificación de los sexos, se contabilizó su frecuencia, en cada periodo de exposición a la hormona y en cada una de las concentraciones (Tabla 2).

Tabla 2. Proporción sexual de la lobina rayada *Morone saxatilis* a los 156 dde, para cada periodo de exposición y para cada concentración de la hormona. Se muestra el número de lobinas y el porcentaje correspondiente de individuos de cada sexo.

Concentración de EE	Periodo de exposición	N	Hembras	Machos	Intersexos	Indiferenciados
10 mg/kg	30-50	16	3.75 %	43.75 %	6.25 %	6.25 %
	45-65	15	66.67 %	26.67 %	6.67 %	0 %
	60-80	15	46.67 %	47.67 %	0 %	6.67 %
20 mg/kg	30-50	15	66.6 %	33.33 %	0 %	0 %
	45-65	16	56.25 %	43.75 %	0 %	0 %
	60-80	15	53.33 %	46.67 %	0 %	0 %

El tratamiento expuesto a la concentración de 10 mg/kg de EE, durante los 45 a 65 dde, obtuvo 10 hembras y 4 machos (2.5:1). Por otro lado, el tratamiento con 20 mg/kg de EE administrado entre los 30 a 50 dde, la proporción de hembras y machos fue de 2:1. En ambos casos, se obtuvo un mayor número de hembras, superando el 50% del total de individuos. En contraste, el resto de los tratamientos presentó una proporción de hembras y machos de alrededor de 1:1.

La frecuencia de gónadas intersexuales e indiferenciadas fue poco frecuente, registrándose sólo dos casos de cada tipo en la concentración de 10 mg/kg de EE.

3.3.2 Muestreo en el día 195 dde

Al igual que para el muestreo a los 156 dde, se recolectó una muestra de todos los tratamientos (N=90) y se hizo el análisis con las técnicas de histología por congelación y en parafina.

Se observaron hembras, machos y organismos intersexuales, pero en ningún caso se distinguieron gónadas indiferenciadas. Las gónadas tuvieron las mismas características descritas para cada sexo en el muestreo del día 156 dde. Las gónadas presentaban un desarrollo más avanzado en comparación con las muestras a los 156 dde, ya que era mayor la distribución de ovocitos y de espermatogonias en estadios avanzados del desarrollo.

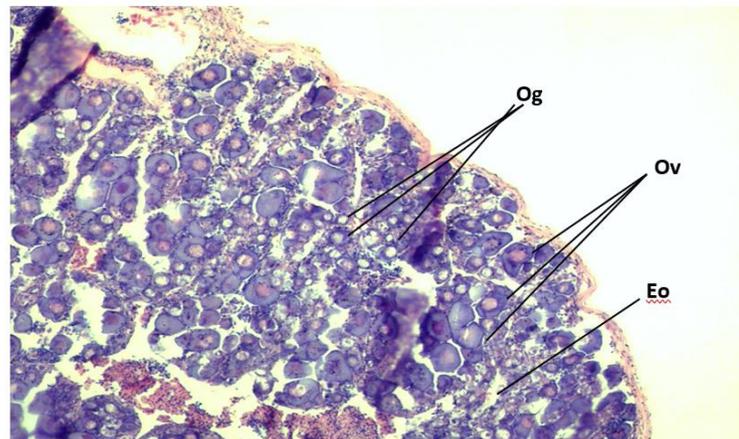


Figura 16. Corte longitudinal de ovario de lobina rayada *Morone saxatilis* de 195 dde (15.61 ± 1.22 cm de longitud total). Se puede observar un mayor número de ovocitos y en un estadio más avanzado del desarrollo de manera que ocupan la mayor parte del estroma ovárico, magnificación 100x. Ov: ovocito, Og: ovogonia, Eo: estroma ovárico

En los ovarios, se observaron ovogonias y ovocitos, estos últimos más numerosos y con una distribución más amplia en el estroma ovárico y con mayor grado de desarrollo (ovocitos previtelogénicos en estadio perinucleolar). También se observó un mayor desarrollo de las lamelas ováricas y de la cavidad ovárica, ambas estructuras con un tamaño mayor en comparación con los ovarios del muestreo a los 156 dde (Figura 16).

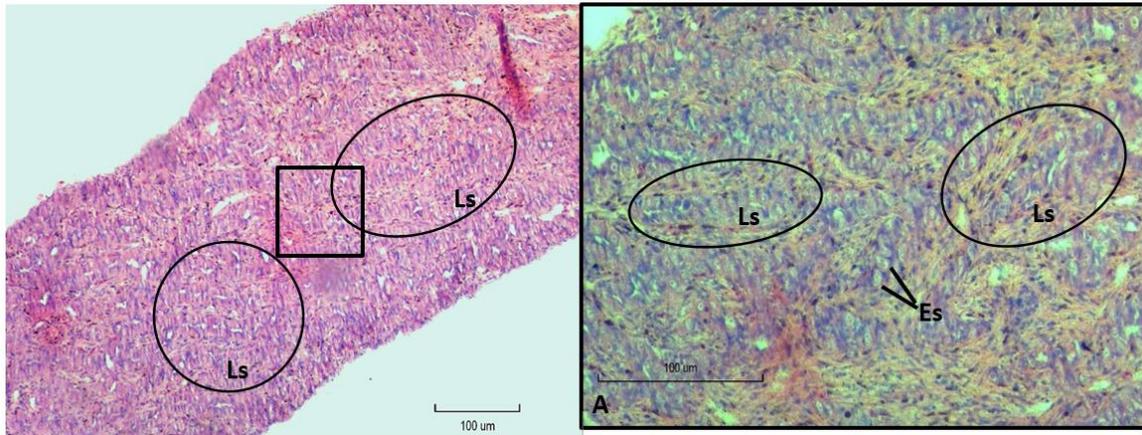


Figura 17. Corte longitudinal de testículo de lobina raya *Morone saxatilis* de 195 dde (15.73 ± 0.90 cm de longitud total). Corte histológico en el que se observan lóbulos espermáticos distribuidos en toda la gónada, magnificación 100X. A. Ampliación, en la que se observa con mayor detalle los lóbulos espermáticos y las espermatogonias, magnificación 400X. Ls: lóbulo espermático, Es: espermatogonia.

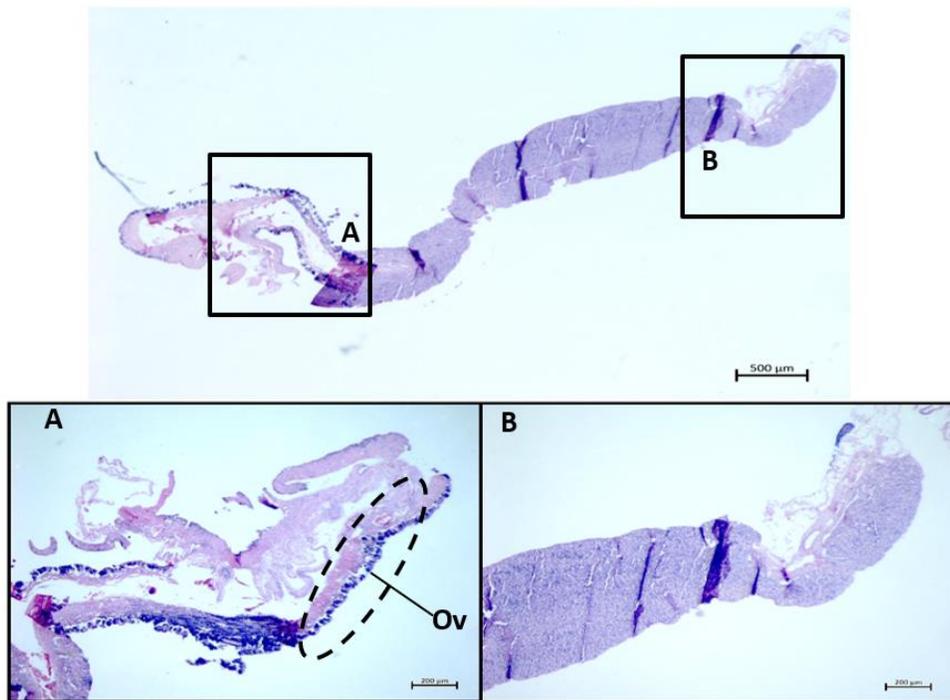


Figura 18. Corte longitudinal de gónada intersexual de lobina raya *Morone saxatilis* de 195 dde (15.25 ± 2.47 cm de longitud total). A. Ampliación de la región de la gónada diferenciada en tejido ovárico, con la presencia de ovocitos de color morado intenso, magnificación 80X. B. Ampliación de la región de la gónada diferenciada en tejido testicular, magnificación 80X. Ov: ovocitos

En los testículos, se observó la presencia de espermatogonias, lóbulos espermáticos, pero su número y distribución fue mayor en comparación con los testículos de las muestras a los 156 dde (Figura 17). Las gónadas intersexuales, tuvieron características muy similares a las observadas a los 156 dde, con regiones ováricas y testiculares, ubicadas en extremos opuestos de la gónada (Figura 18).

3.3.2.1 Descripción de la proporción sexual a los 195 dde

En los tratamientos expuestos a la hormona durante los 30 a 50 dde, se produjo un mayor número de hembras que de machos, en la concentración de 10 mg/kg de EE la proporción fue de 2:1 entre hembras y machos, mientras que a la concentración de 20 mg/kg de EE se obtuvo una proporción entre hembras y machos de 4:1 (Tabla 4).

Sin embargo, también se observó la producción de un mayor número de hembras en el tratamiento de 20 mg/kg de EE durante los 60 a 80 dde, al obtener 11 hembras y 4 machos (2.75:1). En el resto de los tratamientos se registró una proporción sexual de alrededor de 1:1 (Tabla 3).

Tabla 3. Proporción sexual de la lobina rayada *Morone saxatilis* a los 195 dde, para cada periodo de exposición hormonal y concentración de 17 α -etinilestradiol (EE). Se indica el porcentaje de individuos de cada sexo por periodo de exposición y concentración de EE.

Concentración de EE	Periodo de exposición	N	Hembras	Machos	Intersexos
10 mg/kg	30-50	15	66.67 %	33.33 %	0 %
	45-65	15	46.67 %	40 %	13.33 %
	60-80	15	60 %	40 %	0 %
20 mg/kg	30-50	15	80 %	20 %	0 %
	45-65	15	46.67 %	53.33 %	0 %
	60-80	15	73.33 %	26.67 %	0 %

En el caso de lobinas con gónadas intersexuales, solo se observaron en la concentración de 10mg/kg de EE, en el tratamiento de los 45 a 65 dde.

3.3.3 Muestreo de los tratamientos control a los 130 dde

El análisis histológico de las gónadas de los peces del tratamiento control a los 130 dde, mostró que se encontraban en un estado prematuro del desarrollo gonadal, por lo que la identificación se realizó con

base en la presencia de cavidad ovárica y la posición de células sexuales (ovogonias o espermatogonias) en la gónada.

Las gónadas que carecían de cavidad ovárica, y en las que se observó la presencia de espermatogonias (identificables por su tamaño ($\geq 10 \mu\text{m}$) y su forma ovalada con un núcleo grande) en la periferia interna de la gónada muy cerca de la túnica albugínea, se clasificaron como testículo (Figura 19).

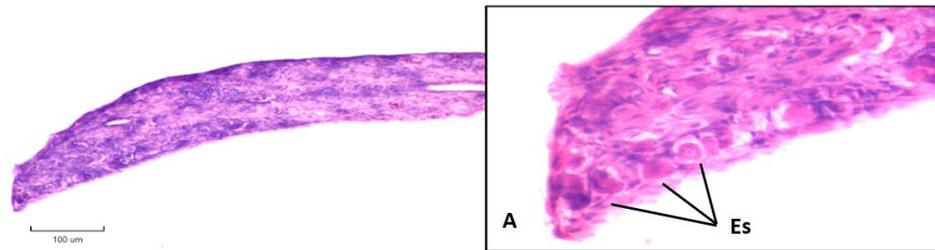


Figura 19. Corte longitudinal de un posible testículo de lobina rayada *Morone saxatilis* de 130 dde (11.28 ± 0.8 cm de longitud total). Vista panorámica de testículo de lobina rayada, magnificación 100X. A. Ampliación de un extremo de testículo en el cual se observan espermatogonias en la periferia de la gónada, magnificación 1000X. Es: espermatogonias

Los ovarios se identificaron por la cavidad ovárica a lo largo de la región central, delimitada por un epitelio germinal, y por la presencia de ovogonias (identificables por su forma circular u ovalada, con un diámetro $\geq 10 \mu\text{m}$) en la periferia de la cavidad ovárica (Figura 20).



Figura 20. Corte longitudinal de un ovario de lobina rayada *Morone saxatilis* de 130 dde (10.58 ± 0.76 cm de longitud total). Se puede observar la cavidad ovárica y ovogonias en el epitelio germinal que la limita. Co: cavidad ovárica, Og: ovogonia

3.3.3.1 Proporción sexual de los tratamientos control con 130 dde

A partir del tratamiento control el número de hembras fue de 7 (47%) y de 8 machos (53%), quedando una proporción de los sexos de 1:1. Además, en este muestreo no se observaron gónadas intersexuales, ni gónadas indiferenciadas.

3.4 Descripción del desarrollo gonadal

La descripción del desarrollo gonadal en este trabajo se basó en el análisis de los muestreos realizados en el tratamiento control, a partir de las muestras de los días 39, 60, 72 y 81 dde.

3.4.1 Desarrollo gonadal a los 39 dde

A los 39 dde (2.34 ± 2.66 cm de longitud total) las gónadas se encontraban indiferenciadas, con 1 o 2 células germinales ubicadas en el extremo terminal de la gónada, con una mayor cantidad de tejido somático (Figura 21).

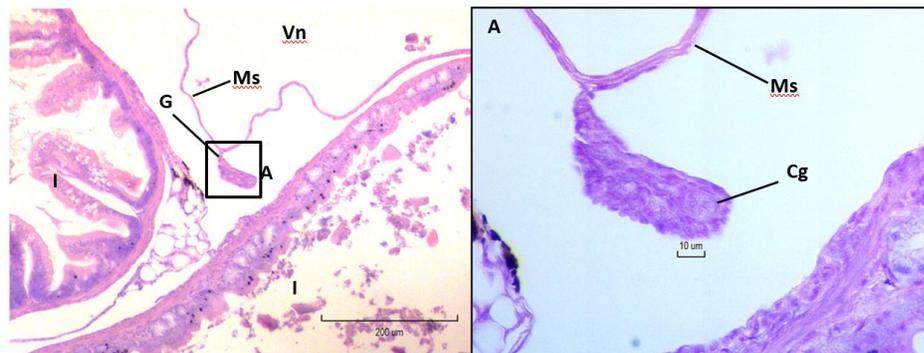


Figura 21. Corte transversal de una larva de lobina rayada *Morone saxatilis* de 39 dde (2.34 ± 0.2 cm de longitud total). Gónada encontrada entre el intestino y la vejiga gaseosa, unida al peritoneo por los mesenterios (100X). A. Ampliación de la gónada donde se observa el mesenterio que une al peritoneo, el tejido somático, una célula germinal (400X). Cg: célula germinal, G: gónada, I: intestino, Ms: mesenterio, Vn: vejiga natatoria.

3.4.2 Desarrollo gonadal a los 60 dde

En esta edad no se observó la cavidad ovárica en las muestras procesadas, por lo que es posible que los peces muestreados en este día se pudieron haber desarrollado en un futuro como machos, debido a la

falta de una cavidad ovárica y la presencia de células germinales en el extremo distal de la gónada. Las gónadas presentaban un mayor tamaño con respecto a los 39 dde (Figura 22)

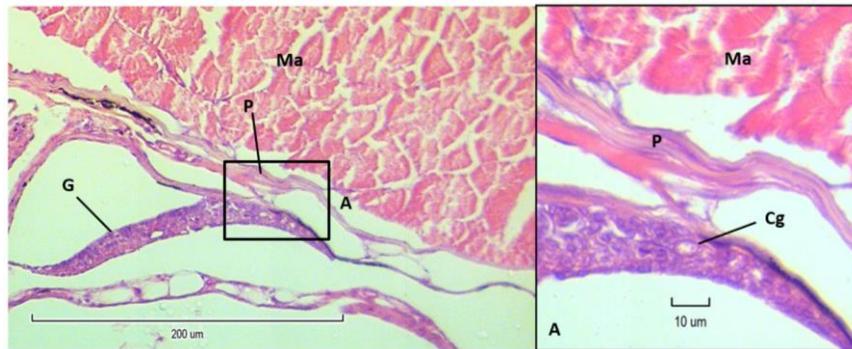


Figura 22. Corte transversal de una larva de lobina rayada *Morone saxatilis* de 60 dde (4.87 ± 0.6 cm de longitud total). La gónada se encuentra unida al peritoneo, entre el músculo de la pared abdominal y el intestino (100X). A. Ampliación de la gónada donde se observa una célula germinal (400X). Cg: célula germinal, G: gónada, Ma: músculo abdominal, P: peritoneo.

3.4.3 Desarrollo gonadal a los 75 dde

En esta etapa del desarrollo se observó un aumento en el número de células germinales dentro de la gónada, así como un aumento en el tamaño de la gónada. Las células germinales se ubicaban en la periferia de la gónada, lo que indicó que este organismo muy probablemente se diferenciaría como un macho (Figura 23).

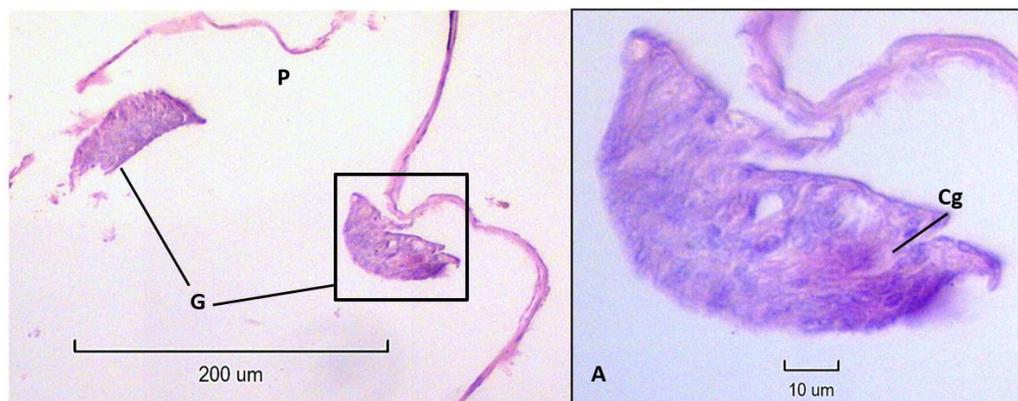


Figura 23. Corte transversal de una larva de lobina rayada *Morone saxatilis* de 75 dde (6.78 ± 0.8 cm de longitud total). Par de gónadas unidas al peritoneo (100X). A. Ampliación de la gónada, donde se observa la presencia de una célula germinal (400X). Cg: célula germinal, G: gónada, P: peritoneo

3.4.4 Desarrollo gonadal a los 81 dde

A esta edad las gónadas aún estaban en un estadio indiferenciado, pero con un mayor tamaño y número de células germinales (Figura 24).

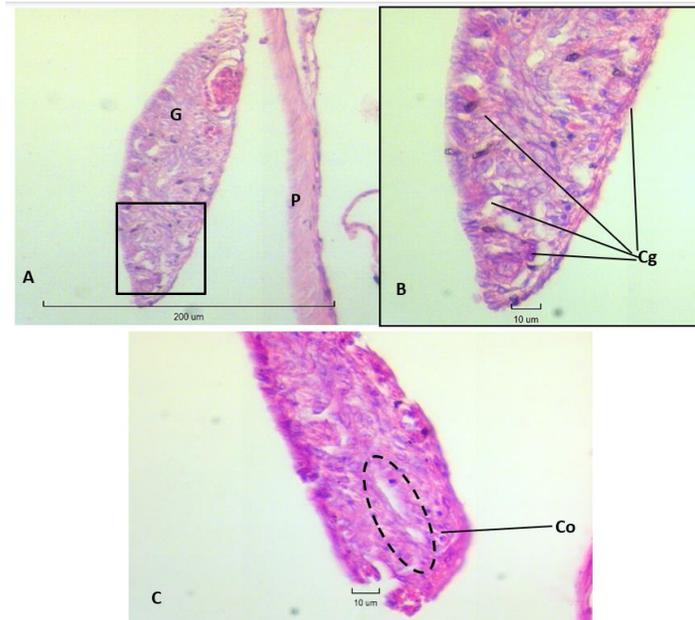


Figura 24. Corte transversal de larva de lobina rayada *Morone saxatilis* de 81 dde (7.31 ± 1.2 cm de longitud total). A. Gónada unida al peritoneo (100X). B. Ampliación de la gónada, con la presencia de varias células germinales (400X). C. Gónada con la presencia de cavidad ovárica, en la región central de la gónada. Cg: célula germinal, G: gónada, P: peritoneo, Co: cavidad ovárica.

3.5 Descripción de las alteraciones gonadales por efecto de la exposición al 17α -etinilestradiol (EE)

Para la descripción de las alteraciones en las gónadas, inducidas por el EE suministrado a través del alimento, se compararon las muestras recolectadas después de cada periodo de exposición a cada una de las dos concentraciones de EE y se compararon con las muestras del tratamiento control. Las comparaciones se realizaron con base en la longitud patrón de los organismos.

3.5.1 Alteraciones gonadales en los periodos de exposición hormonal (30-50 dde; 45-65 dde; 60-80 dde)

Al comparar las laminillas histológicas de los tratamientos experimentales y de control, no se observaron diferencias histológicas significativas en la estructura interna de las gónadas. En todas las muestras se observó la presencia de células germinales ($\geq 10 \mu\text{m}$), el cambio más evidente fue el incremento del tamaño de las gónadas (Figura 25, Figura 26 y Figura 27).

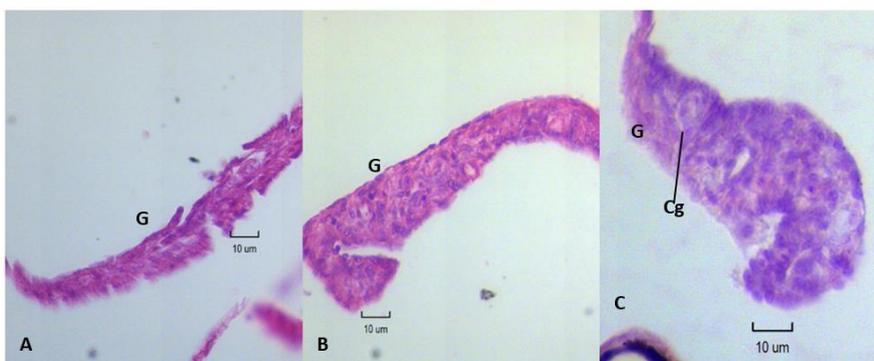


Figura 25. Cortes longitudinales de las gónadas de lobina rayada *Morone saxatilis* al final del primer periodo de administración hormonal a los 50 dde, A. Gónada de ejemplar expuesto a 10 mg/kg de EE (29.49 ± 2.82 mm) y B. Gónada de ejemplar expuesto a 20 mg/kg de EE (29.98 ± 3.87 mm). C. Gónada del tratamiento control sin EE, de 48 dde (30.65 ± 4.28 mm). G: gónada, Cg: célula germinal.

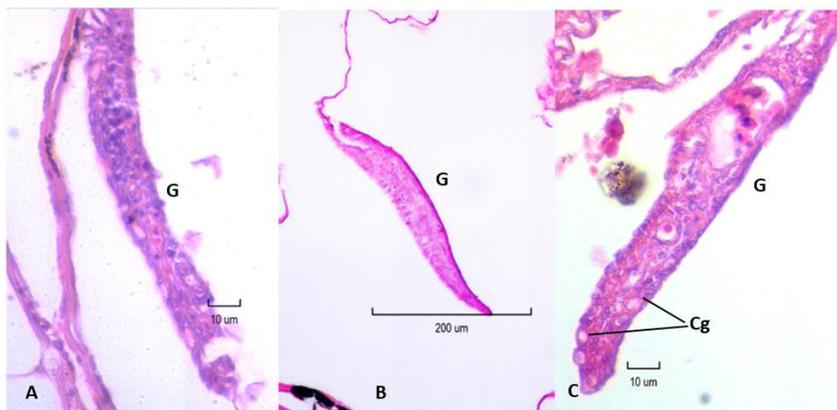


Figura 26. Cortes transversales de las gónadas de lobina rayada *Morone saxatilis* al final del segundo periodo de administración hormonal a los 65 dde, A. Gónada de ejemplar expuesto a 10 mg/kg de EE (42.57 ± 8.14 mm) y B. Gónada de ejemplar expuesto a 20 mg/kg de EE (44.72 ± 4.63 mm). C. Gónada del tratamiento control sin EE, de 66 dde (49.47 ± 6.1 mm). G: gónada, Cg: célula germinal.

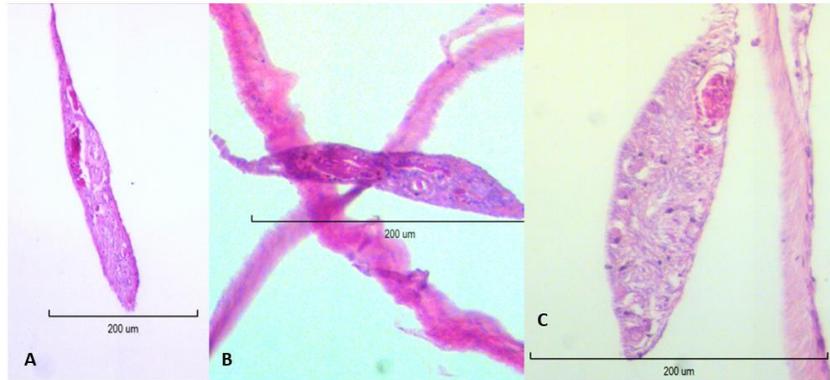


Figura 27. Cortes transversales de las gónadas de lobina rayada *Morone saxatilis* al final del tercer periodo de administración hormonal de 80 dde (100x), A. Gónada de ejemplar expuesto a 10 mg/kg de EE (59.38 ± 4.72 mm) y B. Gónada de ejemplar expuesto a 20 mg/kg de EE (58.66 ± 5.35 mm). C. Gónada del tratamiento control sin EE, de 78 dde (60.6 ± 4.53 mm).

A partir de los cortes histológicos de 156 dde, en algunas muestras se observó una acumulación de células con una forma circular y un tamaño de entre 3-5 μm , con un núcleo muy denso (Figura 28). Esto se observó en los machos y las hembras en el primer y tercer periodo de exposición con una concentración de 10 mg/kg y en el primer periodo de exposición a la concentración de 20 mg/kg.

En algunos machos se observó una mayor cantidad de tejido conectivo entre los lóbulos espermáticos (Figura 29).

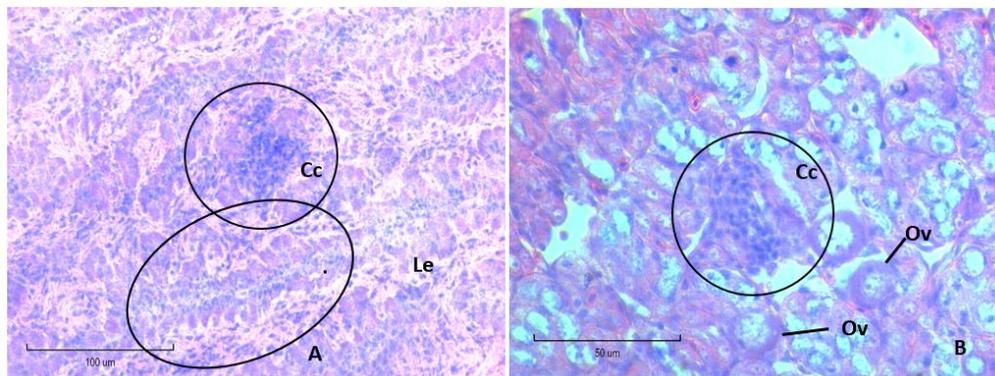


Figura 28. Cortes histológicos de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde. A. Región medular de testículo (13.2 cm de longitud total). B. Región medular de ovario (17 cm de longitud total). En ambos se ilustra una acumulación de células con los núcleos teñidos intensamente y de una forma circular (indicados con un círculo). Le: lóbulo espermático, Ov: ovocito, Cc, cumulo celular.

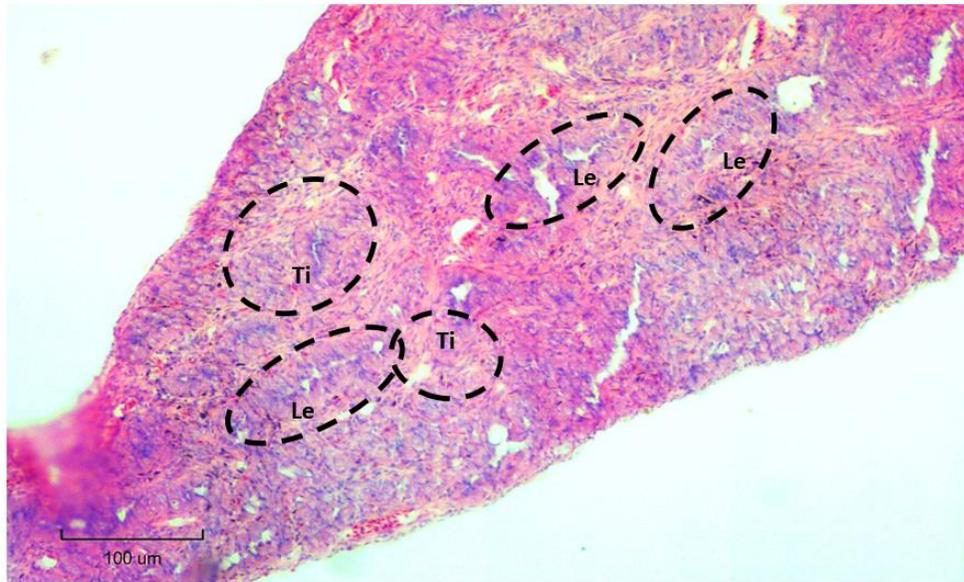


Figura 29. Testículo de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde (14.7 cm de longitud total), en el cual se distingue una gran cantidad de tejido conectivo entre los lóbulos espermáticos. Ti: tejido intersticial, Le: lóbulo espermático

3.6 Análisis de la relación del sexo con la longitud patrón y el peso

3.6.1 Muestreo del día 156 dde

Se realizó una comparación estadística de la longitud patrón y el peso, entre las hembras y machos de cada tratamiento y posteriormente entre cada periodo de exposición a la hormona. En la longitud patrón entre las hembras y machos del mismo tratamiento.

No se encontraron diferencias significativas, tampoco con las hembras y machos del resto de tratamientos, en ambas concentraciones de EE. Excepto en el tratamiento t20-1, que fue expuesto al EE entre los 30 a 50 dde a la concentración de 20 mg/kg de EE, en el que la longitud patrón fue mayor ($P > 0.05$), con respecto al resto de los tratamientos (Figura 30).

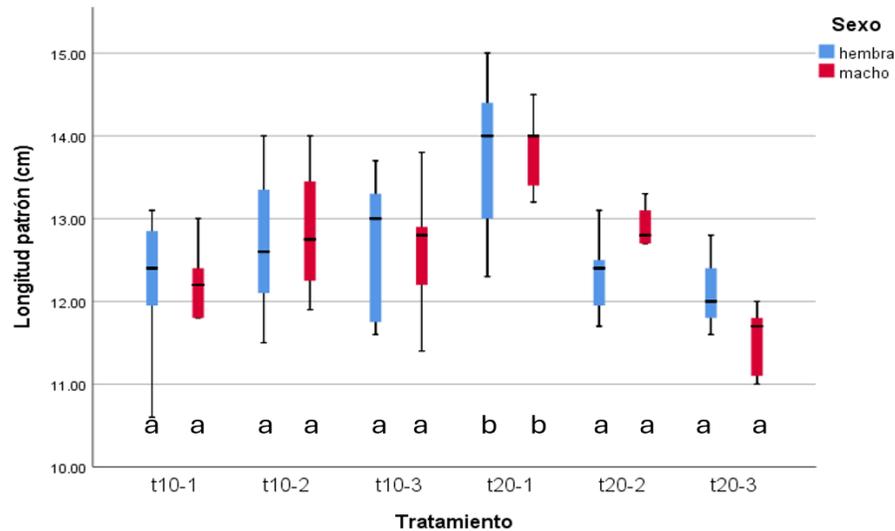


Figura 30. Diagrama de cajas y bigotes en paralelo de la longitud patrón de la lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde, para cada tratamiento experimental. Las barras verticales expresan la desviación estándar. Tratamientos: t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde.

El análisis del peso indicó que no hubo diferencias significativas entre las hembras y machos del mismo tratamiento, tampoco con el resto de las hembras y machos de los otros tratamientos, en ambas concentraciones de EE. Sin embargo, en las lobinas entre los 30 a 50 dde y expuestas a la concentración de 20 mg/kg de EE (tratamiento t20-1), se observó una diferencia significativa ($P > 0.05$) con el resto de los tratamientos, al alcanzar los pesos más altos (Figura 31).

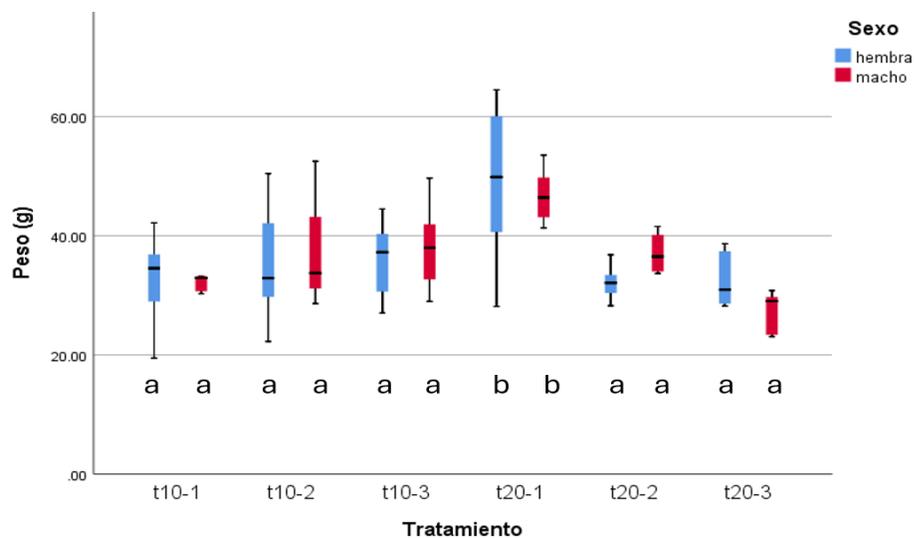


Figura 31. Diagrama de cajas y bigotes en paralelo del peso de lobina rayada *Morone saxatilis* de 156 dde, de cada tratamiento experimental. Las barras verticales expresan la desviación estándar. Tratamientos: t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde.

3.6.2 Muestreo del día 195 dde

En la comparación de la longitud patrón, se observó que no existían diferencias significativas ($P>0.05$), entre los sexos del mismo tratamiento, ni entre los distintos tratamientos (Figura 32). En el caso del peso, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las hembras y machos del mismo tratamiento, ni entre los distintos tratamientos (Figura 33).

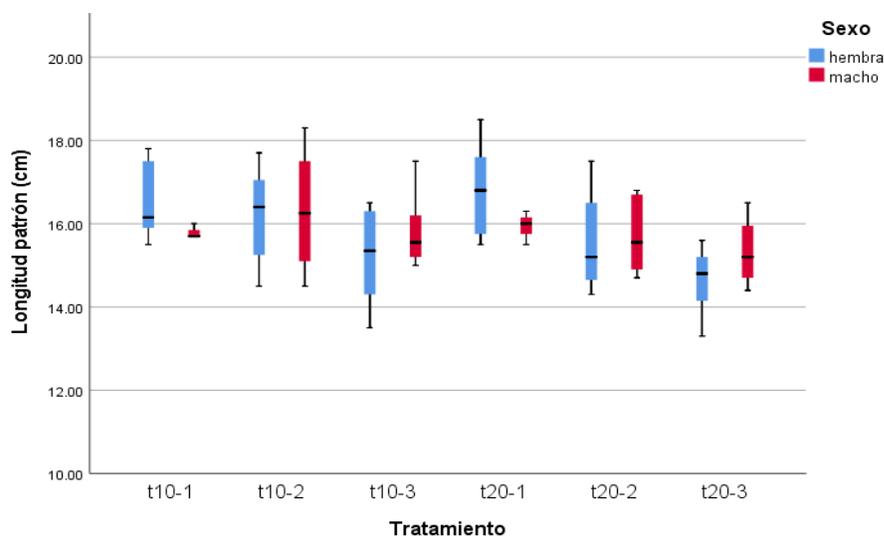


Figura 32. Diagrama de cajas y bigotes en paralelo de las longitudes patrón de la lobina rayada *Morone saxatilis* de 195 dde, de cada tratamiento experimental. Las barras verticales expresan la desviación estándar. Tratamientos: t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde.

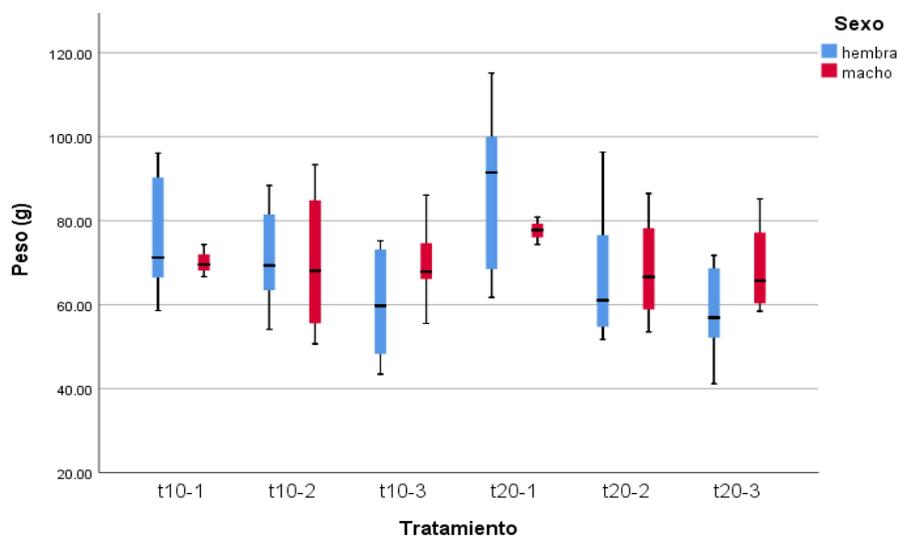


Figura 33. Diagrama de cajas y bigotes en paralelo de los pesos de lobina rayada *Morone saxatilis* de 195 dde, de cada tratamiento experimental. Las barras verticales expresan la desviación estándar. Tratamientos: t10-1, 10 mg/kg de EE de 30-50 dde; t10-2, 10 mg/kg de EE de 45-65 dde; t10-3, 10 mg/kg de EE de 60-80 dde; t20-1, 20 mg/kg de EE de 30-50 dde; t20-2; 20 mg/kg de EE 45-65 dde; t20-3, 20 mg/kg de EE de 60-80 dde.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Supervivencia a lo largo del experimento

A lo largo del experimento, se observó la mortalidad de peces tanto en los tratamientos experimentales como en los controles. Con el paso del tiempo, el número de muertes en los tratamientos experimentales disminuyó progresivamente. Sin embargo, en el tratamiento control esta reducción en el número de muertes ocurrió alrededor de los 107 dde, coincidiendo con la transferencia de los peces del sistema del laboratorio húmedo, a jaulas de malla dentro de un estanque de 9000 L, ubicado en el laboratorio de peces marinos. Este cambio redujo la densidad de cultivo en el tratamiento control.

Todos los peces muertos (excepto los peces que fallecieron entre los 126 y 130 dde, del tratamiento control), presentaron signos de agresión por parte de otros peces, evidenciado por daño o pérdida total de las aletas y los ojos. El comportamiento agresivo entre los peces pudo ser provocado por la alta densidad de cultivo, un factor conocido por desencadenar este tipo de comportamiento debido a la competencia por el alimento entre los peces (Jobling, 1995; Huntingford & Adams, 2005; Azaza *et al.*, 2013). Este comportamiento también se ha reportado en otras especies como en la trucha alpina (*salvelinus alpinus*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y el sargo común (*Diplodus sargo*). Por lo tanto, incluso en especies capaces de tolerar altas densidades, es posible observar estas conductas agresivas (Jobling, 1995; Karakatsouli *et al.*, 2007; Gibtan *et al.*, 2008).

El comportamiento agresivo, también influye en un consumo desigual del alimento entre los peces. Los individuos más agresivos y grandes tienen una mayor oportunidad para acceder al alimento, lo que favorece su crecimiento, en comparación con aquellos individuos menos agresivos y más pequeños (Huntingford & Adams, 2005; Mugwanya *et al.*, 2022). Esta desigualdad en el consumo del alimento, con el paso del tiempo ocasionó una mayor variación en la longitud patrón y en el peso de los organismos.

4.2 Crecimiento y alimentación

A partir de los datos recolectados del peso y de la longitud patrón al final de cada periodo de exposición a la hormona, no se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el tratamiento control a los 50, 65 y 80 dde. No obstante, el peso y longitud patrón de los peces en el

tratamiento control fue mayor en comparación con los tratamientos experimentales, lo que sugiere que el tratamiento con EE pudo afectar el crecimiento. Este efecto podría atribuirse a distintos factores, como el comportamiento de los peces durante la alimentación y la densidad de cultivo, factores que se han observado en tilapia (*Oreochromis niloticus*), salmon del Atlántico (*salmo salar*) y trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Jobling, 1995; Adams y Huntinford, 2005; Fattah et al., 2020).

4.2.1 Comportamiento durante la alimentación

En el presente experimento se observó que los peces expuestos a la hormona mostraron un menor interés por el alimento, así como un comportamiento menos agresivo durante la alimentación. Kenneth y Ludwig (2004) reportaron un comportamiento similar en larvas de lobina híbrida (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) de 60 dde expuestas a estradiol en el alimento (30 mg/kg de alimento) durante 40 días, las cuales presentaron una menor agresividad al alimentarse. Es posible que este comportamiento se deba a un efecto secundario de la administración de hormonas estrogénicas en el alimento, lo cual podría explicarse por un cambio en la palatabilidad en el alimento, reduciendo el consumo de alimento, afectando el crecimiento de los peces.

En otros estudios con distintas especies como en el caso del fletán (*Hippoglossus hippoglossus*), el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) y la lobina europea (*Dicentrarchus labrax*). También se ha reportado un efecto negativo en el crecimiento por la administración de estrógenos en el alimento, aunque no mencionan si esto es debido a un menor consumo de alimento (Johnstone *et al.*, 1979; Gannam & Lovell, 1991; Blazquez *et al.*, 1998; Hendry *et al.*, 2003; Kenneth & Ludwig, 2004). Por lo que es posible que las hormonas estrogénicas además de afectar la palatabilidad del alimento también afecten negativamente el crecimiento de los organismos.

4.2.2 Densidad y el crecimiento de los organismos

Otro factor que pudo haber influido en el crecimiento de los organismos fue la cantidad de peces en los estanques experimentales y de control. Los estanques experimentales, con un volumen de 175 L, contenían 150 peces, mientras que los estanques de 120 L correspondientes al control mantuvieron 250 peces, lo que refleja una diferencia en la densidad de cultivo entre ambos grupos. La comparación de la

longitud patrón y el peso promedio entre los tratamientos sugiere que una mayor densidad de organismos por tanque podría haber favorecido el crecimiento de los peces.

Lo anterior mencionado contrasta con los efectos generalmente observados de la densidad de cultivo sobre el crecimiento de los peces, ya que, en condiciones de alta densidad, suele presentarse una reducción del crecimiento, un deterioro de la salud y una menor supervivencia. Estas respuestas adversas han sido documentadas en varias especies de peces bajo condiciones de cultivo intensivo (Papoutsoglou *et al.*, 1998; Sammouth *et al.*, 2008).

Sin embargo, algunos estudios han demostrado que distintas especies como la lobina europea (*Dicentrarchus labrax*), la carpa común (*Cyprinus carpio*), la tilapia azul (*Oreochromis aureus*), la Dorada (*Sparus aurata*) y la anguila europea (*Anguilla anguilla*), presentan un comportamiento diferente (Papoutsoglou *et al.*, 1998; Saillant *et al.*, 2003; Sammouth *et al.*, 2008; Mayoral Noriega, 2024). En estas especies, una mayor densidad de cultivo puede reducir el estrés al favorecer la formación de grupos naturales o “schooling”, lo que se traduce en un mayor crecimiento y una mejor conversión alimenticia (Papoutsoglou *et al.*, 1998; Mayoral Noriega, 2024). Este mismo efecto fue reportado por Mayoral Noriega (2024) lo que sugiere que la mayor densidad en los estanques de control pudo haber sido un factor determinante en el mayor crecimiento observado en estos organismos.

4.3 Proporción de sexos en los tratamientos y factores que afectaron los resultados

A partir de los muestreos, a los 156 dde los peces de los tratamientos a 10 mg/kg de EE suministrado entre los 45 a 65 dde y a 20 mg/kg de EE entre los 60 a 80 dde, mostraron una mayor proporción de hembras (2.5:1 y 2:1 respectivamente). En el muestreo a los 195 dde, se observó que los tratamientos expuestos a ambas concentraciones de EE, suministrados durante los 30 a 50 dde, presentaron una mayor proporción de hembras (2:1 a 10 mg/kg de EE y 4:1 a 20 mg/kg de EE). Además, en el tratamiento expuesto a 20 mg/kg de EE durante los días 60 a 80 dde, se registraron 11 hembras y cuatro machos, evidenciando un sesgo hacia la feminización.

Es posible que las diferencias en las proporciones sexuales observadas entre los muestreos a los 156 y 195 dde estén relacionadas con factores como las concentraciones de la hormona, la duración del periodo de

exposición, el momento del desarrollo en el que los peces fueron expuestos y la temperatura en la que se mantuvieron los organismos.

4.3.1 Concentración y duración de la exposición a la hormona.

Los resultados indican que las concentraciones de 10 y 20 mg/kg de EE en el alimento, indujeron la producción de un mayor número de hembras, alcanzando un 66.7% de hembras a los 156 dde y un 80 % de hembras a los 195 dde. Aunque la concentración de 20 mg/kg de EE en el alimento, fue la más exitosa, ninguna concentración fue capaz de generar un 100% de hembras.

Estos resultados contrastan con lo reportado por Blazquez *et al.* 1998, quienes lograron generar un 80% de hembras al exponer a la lobina europea (*D. labrax*) a 10 mg/kg de EE en el alimento suministrado entre los 60 a 260 días después de la fertilización (por sus siglas en inglés DPF). En contraste, cuando se expusieron los peces a 17 β -estradiol (E), bajo las mismas condiciones, solo se obtuvo un 13% de hembras. Por otro lado, en experimentos con la misma especie, la exposición a 10 mg/kg de 17 α -metiltestosterona (MT) en el alimento entre los 126 y 226 dde resultó en la producción de entre un 93 % y un 100 % de machos (Blazquez *et al.*, 1995; Blazquez *et al.*,1998).

Estos hallazgos sugieren, que en la lobina europea (*D. labrax*), una concentración de 10 mg/kg en el alimento, ya sea de EE o de MT, es suficiente para la generación mayoritaria de hembras o de machos respectivamente y que el tipo de hormona también influye en el éxito del control del sexo (Blazquez *et al.*, 1995; Blazquez *et al.*,1998).

En el caso de la lobina híbrida (*M. chrysops X M. saxatilis*), Kenneth y Ludwig (2003) expusieron peces de 60 y 103 dde a 30 mg/kg de estradiol (E) en el alimento durante 40 días, produciendo un 100% de hembras. Sin embargo, al usar una concentración de 100 mg/kg de E en el alimento durante 21 días en peces de 62 dde, se obtuvo una proporción sexual de 1:1 (Kenneth y Ludwig, 2003). De manera similar, Gomelsky *et al.* (1999), reportaron que al exponer lobinas híbridas de 92 y 98 dde a 30 mg/kg de MT en el alimento durante 40 y 30 días (respectivamente), produjeron entre un 95 a 97.2% de hembras respectivamente.

Por otro lado, Gomelsky *et al.* (1999), expusieron lobina rayada (*Morone saxatilis*) de 33 y 63 dde a 30 mg/kg de MT durante 30 días, produjeron un 100% de machos en ambos casos. Sin embargo, Schutz y Harrell (1999) reportaron que al exponer la misma especie a una concentración de 2.5 mg/kg de MT en el

alimento durante el periodo de los 19 a 60 dde, se produjo un 82% de machos, lo que indica que, para la producción de machos, se requiere una concentración hormonal menor.

Con base en lo anterior, es probable que las concentraciones usadas en este estudio (10 y 20 mg/kg de EE en el alimento), no hayan sido suficientes para generar un estímulo suficiente que permita alcanzar una proporción del 100% de hembras. Por lo tanto, se recomienda que, para futuros trabajos con lobina rayada, se utilicen concentraciones más altas, como 30 mg/kg de EE en el alimento o superiores, ya que, como reportaron Gomelsky *et al.* (1999), con estas concentraciones se logró un 100 % de machos. Sería pertinente revisar si esta concentración también es apta para la producción mayoritaria de hembras.

En cuanto a la duración de la exposición a la hormona, este factor puede variar entre especies. Por ejemplo, en la lobina europea (*D. labrax*), se requiere una exposición de 100 días o más (Blazquez *et al.*, 1995; Blazquez *et al.*, 1998). Mientras que en la lobina híbrida (*M. chrysops* X *M. saxatilis*) y la lobina rayada (*M. saxatilis*) la duración efectiva de exposición es de entre 30 a 40 días (Gomelsky *et al.*, 1999; Schutz y Harrell, 1999; kenneth y Ludwig, 2003). En este estudio, la duración de la exposición al EE (20 días) pudo no haber sido suficiente, lo que probablemente impidió que el estímulo hormonal se mantuviera el tiempo necesario para generar los efectos deseados.

4.3.2 Momento en el desarrollo, para la administración de la hormona.

A partir de los muestreos a los 156 y 195 dde, se observó que los tratamientos expuestos a ambas concentraciones de 17 α -etinilestradiol (EE), suministradas entre los 30 a 50 dde, presentaron de manera consistente un mayor número de hembras. Este resultado concuerda con lo reportado por Murillo Núñez (2024), quien menciona que el periodo de determinación sexual para la lobina rayada (*M. saxatilis*) se encuentra entre los 32 a 52 dde (2 a 4.9 cm de longitud total, respectivamente). Es durante este periodo, que se observa la aparición de la gónada primordial (32 dde) y el desarrollo de la cavidad ovárica (52 dde). Este periodo corresponde al momento de mayor sensibilidad a los efectos estrogénicos del 17 α -etinilestradiol (Pfiferrer, 2001).

Este periodo de mayor sensibilidad o periodo lábil puede variar entre especies. Por ejemplo, en la lobina europea (*D. labrax*), los efectos de los esteroides exógenos son más evidentes alrededor de los 100 a 120 dde, cuando los peces presentan una longitud de 30 a 70 mm. A los 80 mm, se considera que la

determinación del sexo está completa, ya que los ovarios comienzan a diferenciarse en las hembras (Piferrer, 2005; Vandeputte *et al.*, 2020).

Blazquez *et al.* (1995) probaron el efecto del 17α -etinilestradiol a una concentración de 10 mg/kg en el alimento suministrado a la lobina europea (*D. labrax*) entre los días 60-260 DPF, incluyó el período sensible a dosis equivalentes de andrógenos sintéticos en los 126-226 DPF. Los resultados mostraron un 80% de hembras y 20% de peces estériles. Por el contrario, la exposición al estradiol (no sintético) resultó en 13% de hembras, 57% de individuos intersexuales, 17% de machos y 13% de individuos estériles. En el grupo control, las proporciones fueron de 33% de hembras y 67% de machos. Sin embargo, con una exposición más temprana, entre los días 48-88 DPF, se produjeron 62% de hembras y 38% de machos (Blazquez *et al.*, 1998).

En la lobina rayada (*M. saxatilis*), se ha señalado que utilizando la metiltestosterona, el periodo de mayor sensibilidad se encuentra a partir del día 30 dde (Gomelsky *et al.*, 1999; Schutz & Harrell, 1999). Este resultado coincide con lo observado en el presente estudio, donde los tratamientos con mayor número de hembras se obtuvieron cuando la exposición a la hormona ocurrió entre los días 30 y 50 dde. Por lo tanto, se confirma que, en la lobina rayada, el periodo de mayor sensibilidad a las hormonas exógenas se encuentra entre los 30 a 50 dde, y tiene una duración más corta en comparación con la lobina europea (*D. labrax*).

4.3.3 Efecto de la temperatura

La temperatura es un factor ambiental que tiene un importante efecto en la determinación del sexo en diversas especies de peces (Piferrer, 2001; Devlin & Nagahama, 2002). Durante el desarrollo del experimento, tanto los organismos experimentales como los del tratamiento control se mantuvieron a una temperatura promedio de 23°C, con variaciones de $\pm 1^\circ\text{C}$.

En experimentos realizados con la lobina europea (*D. labrax*), se incubaron larvas a 16°C, y posteriormente a los 11, 32, 53, 74, 90, 104, 118, 132, 146, 160, 174, 188, 202, 216, 230 y 244 dde, se transfirieron a distintos grupos de lobinas a estanques a 21°C. Los grupos que permanecieron a 16°C de los 56 a 75 dde presentaron una proporción de hembras cercana al 50%. En contraste, los grupos que permanecieron a 16°C por un periodo mayor mostraron un aumento en el número de machos. Para el grupo que fue transferido a 21°C a los 230 dde, la proporción de hembras fue del 10%. Este efecto se relacionó con una

disminución en los niveles de expresión del gen de la aromatasa gonadal (*cyp19a1a*), que codifica para una enzima clave en la síntesis de estradiol. Este mecanismo de regulación, determinado por la metilación del promotor del gen de la aromatasa inhibió la producción de estrógenos (Vandeputte *et al.*, 2020).

Al analizar las proporciones sexuales obtenidas en los tratamientos control y experimentales, se observó que algunos tratamientos presentaron una proporción de 1:1, lo que sugiere que la temperatura de cultivo no tuvo un efecto sobre el proceso de determinación sexual en los organismos. Además, no se observó un mayor número de machos en los tratamientos.

Es importante realizar estudios más específicos para evaluar el impacto de la temperatura en la determinación del sexo en la lobina rayada (*M. saxatilis*) y determinar el rango de temperaturas óptimas para cada etapa del cultivo. Según lo descrito por Vandeputte *et al.* (2004) con lobina europea (*D. labrax*), existe una relación entre la temperatura y el proceso de determinación sexual. Por lo tanto, es posible que el cultivo de lobina rayada (*M. saxatilis*) a temperaturas bajas durante el periodo lábil, sea óptimo para la producción mayoritaria de hembras.

4.4 Comparación del desarrollo gonadal

Los resultados descritos en este trabajo se compararon con el estudio de Murillo-Núñez (2024), tomando en consideración la longitud total de los organismos. Las muestras tomadas a los 36, 60, 75 y 81 dde (2.23 ± 0.2 cm, 4.87 ± 0.7 cm, 6.78 ± 0.8 cm y 7.31 ± 1.21 cm, respectivamente) se compararon con las muestras a los 40, 52, 62 y 72 dde (2.57 ± 0.04 cm, 4.97 ± 0.5 cm, 6.63 ± 0.65 cm y 7.36 ± 0.75 cm, respectivamente) de Murillo-Núñez.

Se pudo apreciar que hubo un menor crecimiento en los organismos control del presente estudio en comparación con el crecimiento descrito por Murillo-Núñez (2024). Dado que no se observaron diferencias en la anatomía de las gónadas, es probable que el retraso en el desarrollo gonadal podría estar asociado al menor crecimiento observado de los organismos, a consecuencia de las condiciones de cultivo en las que se encontraban. Además, es importante considerar que factores como la variación en la temperatura, la calidad de agua, la densidad de organismos y el régimen de alimentación, pudieron afectar el crecimiento.

4.5 Alteraciones del desarrollo gonadal

En los cortes histológicos a los 50, 65 y 80 dde, con cada concentración de EE suministrada (10 y 20 mg/kg de EE), no se observaron alteraciones. Al comparar los cortes histológicos de los tratamientos experimentales con los del tratamiento control, no se observaron diferencias en la anatomía de las gónadas. La ausencia de alteraciones histológicas en las gónadas de los organismos tratados con el esteroide podría deberse a que, por el grado de desarrollo, las alteraciones aún no se habían manifestado. La presencia de células germinales y de tejido somático poco diferenciado confirma esta hipótesis.

A los 156 dde, en los tratamientos experimentales con ambas concentraciones (10 y 20 mg/kg de EE), se observaron agregados de células en el tejido somático de la gónada, con un diámetro de 3 a 5 μm , teñidas intensamente de color morado. Este patrón celular sugiere la infiltración de leucocitos al interior del tejido gonadal, y se observó tanto en ovarios como en testículos.

Adicionalmente, en algunos testículos de lobinas expuestas a 10 y 20 mg/kg de EE en el alimento, se identificó una notable cantidad de tejido intersticial entre los lóbulos espermáticos, causado por la acumulación de fibras de colágeno y de fibroblastos. Esto podría atribuirse a una reacción secundaria provocada por la exposición al 17α -etinilestradiol (EE). Oropeza *et al.* (2013), reportaron efectos similares en adultos de tenca (*Tinca tinca*) después de inyectar EE. Sin embargo, dichos autores también describieron alteraciones adicionales como, malformaciones de los túbulos seminíferos, malformaciones en el epitelio germinal y degeneración de las células de Sertoli, las cuales no se observaron en las muestras histológicas de lobina rayada. Con base a la información anterior, dependiendo de la concentración y la vía de administración de la hormona, los efectos pueden variar en intensidad generando alteraciones en el tejido gonadal en mayor o menor grado.

En cuanto a la acumulación de células en el tejido somático de las gónadas, es posible que estas células correspondan a leucocitos, las cuales además de desempeñar un papel inmunológico en el organismo, también desempeñan un papel en la remodelación tisular, eliminando células muertas o dañadas. Este fenómeno también ha sido reportado en estudios que emplean hormonas exógenas, como el etinilestradiol. Por ejemplo, Luzio *et al.*, (2016) expusieron a ejemplares adultos del pez cebra a 17α -etinilestradiol (4 ng/L), fradosol (50 ng/L) y una combinación de ambos compuestos, encontraron alteraciones en las gónadas. En los testículos, se observó el alargamiento de ductos espermáticos, la existencia de líquido intersticial, separación de la membrana basal y la presencia de ovocitos

intratesticulares. En los ovarios, se observaron ovocitos atrésicos, signos de inflamación (caracterizado por aglomeraciones celulares) y cambios en el tejido intersticial (Luzio *et al.*, 2016).

Cabe destacar que las alteraciones observadas en las muestras histológicas a los 156 dde no se presentaron en los cortes correspondientes al día 195 dde. Esto sugiere que los efectos adversos de la exposición a la hormona podrían ser transitorios, dependientes del tiempo y de las condiciones específicas del experimento.

En cuanto a las gónadas intersexuales en la lobina rayada (*M. saxatilis*) observadas a los 156 y 195 dde, es posible que su formación se deba al efecto de la exposición al 17α -etinilestradiol. Blazquez *et al.* (1998) reportaron que la exposición a 10 mg/kg de estradiol en el alimento suministrado a lobinas rayadas (*M. saxatilis*) entre los 60 a 260 dde resultó en un 13 % de hembras, 17 % de machos, 13 % de organismos estériles y un 57 % de organismos intersexuales. En estos últimos, las gónadas contenían tejido germinal de ambos sexos (machos y hembras), con grupos de ovogonias y de ovocitos previtelogénicos rodeando una cavidad ovárica rudimentaria, mientras que los lóbulos espermáticos se encontraban en la periferia de la gónada. Dentro de este grupo, el 10% carecía de una cavidad ovárica y lóbulos espermáticos con ovocitos intratesticulares dispersos en el tejido. Por otro lado, las gónadas estériles tenían una forma filiforme y consistían en tejido conectivo vacuolizado, desprovisto de células germinales.

Estos resultados sugieren que, en un principio, estos peces estaban programados para desarrollarse como machos; sin embargo, la exposición a estradiol indujo el desarrollo parcial de tejido gonadal femenino en las gónadas (Blazquez *et al.*, 1998). Con base en esto, se puede especular que la aparición de gónadas intersexuales en el presente experimento es el resultado de un efecto parcial de la hormona, posiblemente debido a una dosis insuficiente, un tiempo de exposición inadecuado o la combinación de ambos factores, lo que alteró el proceso de diferenciación sexual. Esto sugiere que serían necesarias concentraciones más altas de EE o un periodo de exposición más prolongado para asegurar una mayor proporción de hembras.

En el presente experimento, el tejido germinal femenino y masculino de las gónadas intersexuales, se encontraba localizado en extremos opuestos de la gónada. La incidencia de este tipo de gónadas fue de sólo el 2 % del total de muestras analizadas a los 156 y 195 dde.

Morgan y Gerlach (1950), reportaron que casi el 3% de lobinas rayadas (*M. saxatilis*) salvajes muestreadas en el río Coos, Oregón, eran hermafroditas.

Schutz y Harrell (1999), reportaron que al exponer lobina rayada (*M. saxatilis*) a 2.5 y 5 mg/kg de metiltestosterona en el alimento, produjeron de 7 a 8% de peces intersexuales, cuyas gónadas presentaban regiones diferenciadas con ovogonias y con espermatogonias. Esto sugiere que los peces originalmente eran hembras cuya diferenciación sexual fue parcial debido a la acción de la metiltestosterona, la presencia de cordones ovígeros en las gónadas apoyó esta hipótesis.

En el presente estudio, las gónadas intersexuales presentaron un arreglo del tejido similar al descrito anteriormente. Es posible que su origen se deba a la acción del EE sobre machos en pleno proceso de diferenciación sexual, generando un desarrollo gonadal intermedio.

El desarrollo de organismos intersexuales es un efecto común, aunque en baja proporción, en tratamientos hormonales para la producción de cultivos monosexuales. Como se mencionó, esto podría deberse a una exposición hormonal parcial o insuficiente, que interacciona con las hormonas androgénicas y estrogénicas naturalmente producidas por la gónada.

4.6 Comparación de la longitud patrón y el peso con el sexo de los organismos de cada tratamiento

A partir de los muestreos de 156 y 195 dde, no se observaron diferencias significativas en la longitud patrón y el peso entre machos y hembras en la mayoría de los tratamientos. Sin embargo, en el tratamiento expuesto a 20 mg/kg de EE entre los 30 y 50 dde, se registraron los pesos y longitudes mayores en el muestreo a los 156 dde. A los 195 dde, aunque esta diferencia dejó de ser significativa en comparación con los demás tratamientos, los organismos de este grupo continuaron presentando los mayores valores de peso y longitud patrón.

Este fenómeno podría deberse a un crecimiento compensatorio de los organismos tras la exposición temprana a la hormona. Luego del tratamiento con EE, los peces pudieron haber experimentado un período de hiperfagia y un aumento en la eficiencia de conversión alimenticia, lo que les permitió superar en crecimiento a los demás tratamientos. Posteriormente, este crecimiento se habría estabilizado, igualándose con el resto de los grupos.

El crecimiento compensatorio se ha descrito en distintas especies, incluyendo salmónidos, ciprínidos, perciformes, Pleuronectiformes, peces gato, ciclidos, gadidos, lobina europea (*D. labrax*) y lobina híbrida.

Este fenómeno se caracteriza por un crecimiento acelerado tras la eliminación de factores que limitaban el desarrollo (Hornick *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2003; Won y Borski, 2013).

Se puede suponer que, al finalizar la exposición a la hormona, los peces se encontraban con reservas energéticas reducidas, lo que activó un mecanismo de crecimiento compensatorio. Esto sugiere que el EE tenía un efecto adverso sobre su crecimiento o que la alteración en la palatabilidad del alimento redujo su consumo. La magnitud de la respuesta compensatoria depende de la duración y la severidad de las condiciones adversas, de modo que, a mayor restricción, mayor es el efecto compensatorio en el crecimiento. En este caso, la exposición a 20 mg/kg de EE en el alimento entre los 30 a 50 dde, mostró efectos más adversos, generando un crecimiento compensatorio más marcado.

Por otro lado, la ausencia de diferencias en la longitud patrón y el peso entre machos y hembras dentro de cada tratamiento puede explicarse por el estado de inmadurez sexual de los organismos. Al no haber alcanzado un desarrollo sexual suficiente, los peces no invirtieron energía en la maduración gonadal, sino en el crecimiento somático. En esta especie, los machos alcanzan la pubertad antes que las hembras, entre el primero y segundo año, lo que reduce su tasa de crecimiento debido a la demanda energética requerida para la maduración sexual. En cambio, las hembras maduran alrededor de los cuatro años, lo que les permite crecer durante un periodo más prolongado antes de alcanzar la madurez sexual, logrando así mayores tallas. Esto explica la falta de diferencias en peso y longitud entre sexos en los organismos analizados. De manera similar a lo reportado por Kenneth y Ludwig (2003) con lobinas híbridas.

Capítulo 5. Conclusiones

La exposición a la hormona sintética 17 α -etinilestradiol a una concentración de 20 mg/kg en el alimento y suministrada entre los días 30 a 50 dde, es capaz de producir una mayor proporción de hembras (80% a los 195 dde). Sin embargo, la exposición entre los 60 y 80 dde también indujo una mayor proporción de hembras en comparación con el grupo control.

La exposición a la hormona por un periodo de 20 días fue suficiente para la producción mayoritaria de hembras en los tratamientos expuestos entre los 30 a 50 dde. Sin embargo, con base en los resultados de otros estudios en los que la lobina rayada se expuso a la metiltestosterona, se recomienda que la duración de la exposición al 17 α -etinilestradiol se realice por un periodo mayor de treinta días o más.

La concentración de 10 mg/kg de EE en el alimento suministrado de los 30 a los 50 dde, fue capaz de producir un 67% de hembras, mientras que la concentración de la hormona a 20 mg/kg en el alimento produjo hasta un 80 % de hembras. Este resultado indica que para lograr una transformación total de la progenie (100%) es necesario evaluar el uso de concentraciones de EE superiores a 20 mg/kg de alimento, para asegurar la producción mayoritaria de hembras.

En relación con el periodo del desarrollo más adecuado para la exposición de los peces a la hormona, el mayor éxito se tuvo entre los 30 y 50 dde, lo cual confirma que este es el periodo lábil para la especie y es el periodo de mayor sensibilidad a los efectos de la exposición a las hormonas exógenas.

Las concentraciones de 10 y 20 mg/kg de EE en el alimento no ocasionaron alteraciones en el desarrollo de las gónadas, sin embargo, se registró una reducida proporción de organismos intersexuales.

Literatura citada

- Adams, C., & Huntingford, F. (2005). Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behaviour*, 142(9-10), 1207-1221. <https://doi.org/10.1163/156853905774539382>
- Ali, M., Nicieza, A., & Wootton, R. J. (2003). Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish And Fisheries*, 4(2), 147-190. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x>
- Andersen, L. K., Abernathy, J., Berlinsky, D. L., Bolton, G., Booker, M. M., Borski, R. J., Brown, T., Cerino, D., Ciaramella, M., Clark, R. W., Frinsko, M. O., Fuller, S. A., Gabel, S., Green, B. W., Herbst, E., Hodson, R. G., Hopper, M., Kenter, L. W., Lopez, F., . . . Reading, B. J. (2021). The status of striped bass, *Morone saxatilis*, as a commercially ready species for U.S. marine aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 52(3), 710-730. <https://doi.org/10.1111/jwas.12812>
- Azaza, Assad, A., Maghrbi, W., & El-Cafsi, M. (2013). The effects of rearing density on growth, size heterogeneity and inter-individual variation of feed intake in monosex male Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Animal*, 7(11), 1865-1874. <https://doi.org/10.1017/s1751731113001493>
- Baroiller, J., D'Cotta, H., & Saillant, E. (2009). Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation. *Sexual Development*, 3(2-3), 118-135. <https://doi.org/10.1159/000223077>
- Budd, A., Banh, Q., Domingos, J., & Jerry, D. (2015). Sex Control in Fish: Approaches, Challenges and Opportunities for Aquaculture. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3(2), 329-355. <https://doi.org/10.3390/jmse3020329>
- Blázquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., & Donaldson, E. M. (1995). Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture*, 135(4), 329-342. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01030-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01030-0)
- Blázquez, M., Zanuy, S., Carrillo, M., & Piferrer, F. (1998). Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 β and 17 α -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18(1), 37-47. <https://doi.org/10.1023/a:1007736110663>
- Cabrera Lozano, R. (2019). Efecto de la temperatura en la proporción de sexos de *Totoaba macdonaldi*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2827>

- Cook, A. M., Duston, J., & Bradford, R. G. (2006). Thermal tolerance of a northern population of striped bass *Morone saxatilis*. *Journal of Fish Biology*, 69(5), 1482-1490. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01211.x>
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex Determination and Sex Differentiation in Fish: An Overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4), 191-364. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00057-1)
- Escuredo Vielba, R. (2018). Identificación y caracterización de las células germinales primordiales (CGPs) en embriones y larvas de *Totoaba macdonaldi*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2535>
- Extavour, C. G., & Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869-5884. <https://doi.org/10.1242/dev.00804>
- Fattah, A. F. A., Ahmed, F. A., Saleem, A. Y., Mohammed, H. H., Youssef, M. I., & Said, E. N. (2020). Effect of the different stocking density on behavior, performance and welfare of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(5), 539-560. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.109369>
- Fisheries & Aquaculture (FAO). (2005, June 6). *Dicentrarchus labrax*. Recuperado de https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/dicentrarchus_labrax?lang=en
- Gannam, A., & Lovell, R. (1991). Effects of feeding 17 α -methyltestosterone, 11-ketotestosterone, 17 β -estradiol, and 3,5,3'-triiodothyronine to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 92, 377-388. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90043-7)
- Gibtan, A., Getahun, A., & Mengistou, S. (2008). Effect of stocking density on the growth performance and yield of Nile tilapia [*Oreochromis niloticus*(L., 1758)] in a cage culture system in Lake Kuriftu, Ethiopia. *Aquaculture Research*, 39(13), 1450-1460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02021.x>
- Harrell, R. M. (Ed.). (1997). Striped bass and other *Morone* culture. Elsevier Science. <https://books.google.com.mx/books?id=pddjwQSCBmAC>
- Hendry, C. I., Martin-Robichaud, D. J., & Benfey, T. J. (2003). Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 219(1-4), 769-781. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00344-7](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00344-7)
- Hoga, C. A., De Almeida, F. L., & Reyes, F. G. R. (2018). A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues. *Cyta-journal of Food*, 16(1), 679–691. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1475423>

- Hornick, J., Van Eenaeme, C., Gérard, O., Dufrasne, I., & Istasse, L. (2000). Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domestic Animal Endocrinology*, 19(2), 121-132. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(00\)00072-2](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(00)00072-2)
- Huntingford, F., & Adams, C. (2005). Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behaviour*, 142(9-10), 1207-1221. <https://doi.org/10.1163/156853905774539382>
- Jobling, M. (1995). Simple indices for the assessment of the influences of social environment on growth performance, exemplified by studies on Arctic charr. *Aquaculture International*, 3(1). <https://doi.org/10.1007/BF00240922>
- Johnstone, R., Simpson, T., & Walker, A. (1979). Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*, 18(3), 241-252. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(79\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(79)90015-2)
- Kikuchi, K., & Hamaguchi, S. (2013). Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*, 242(4), 339-353. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23927>
- Morgan, A. R., & Gerlach, A. R. (1950). Striped bass studies on Coos Bay, Oregon in 1949 and 1950. *ScholarsArchive@OSU*. Recuperado de <https://ir.library.oregonstate.edu/concern/defaults/8623j359c>
- Montes Montes, M. (2014). Diferenciación sexual del lenguado de California *Paralichthys californicus* y control de la proporción sexual mediante la utilización de la hormona 17 β -estradiol. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/129>
- Mugwanya, M., Dawood, M. A., Kimera, F., & Sewilam, H. (2022). A review on recirculating aquaculture system: influence of stocking density on fish and crustacean behavior, growth performance, and immunity. *Annals Of Animal Science*, 22(3), 873-884. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0014>
- Murillo Núñez, E. d. L. (2024). Diferenciación gonadal e identificación del periodo lábil para el control del sexo en la lobina rayada, *Morone saxatilis*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional: <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/4055>
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5991, Ethinyl estradiol. Consultado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethinyl-estradiol>
- Papoutsoglou, S., Tziha, G., Vrettos, X., & Athanasiou, A. (1998). Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in

- a closed circulated system. *Aquacultural Engineering*, 18(2), 135-144. [https://doi.org/10.1016/s0144-8609\(98\)00027-2](https://doi.org/10.1016/s0144-8609(98)00027-2)
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1–4), 229–281. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00589-0)
- Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., & González, A. (2005). Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 142(1–2), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.02.011>
- Piferrer, F. (2009). Determinación y diferenciación sexual en los peces. En: Carrillo, M. (Comp.), La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Madrid. pp. 247-312. <https://www.observatorio-acuicultura.es/recursos/publicaciones/la-reproduccion-de-los-peces-aspectos-basicos-y-sus-aplicaciones-en>
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., & Cerdà, J. (2009). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General And Comparative Endocrinology*, 165(3), 367-389. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>
- Saillant, E., Fostier, A., Haffray, P., Menu, B., Laureau, S., Thimonier, J., & Chatain, B. (2003). Effects of rearing density, size grading and parental factors on sex ratios of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in intensive aquaculture. *Aquaculture*, 221(1-4), 183-206. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00539-2](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00539-2)
- Sammouth, S., D'Orbcastel, E. R., Gasset, E., Lemarié, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J., Fivelstad, S., & Blancheton, J. (2008). The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering*, 40(2), 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.11.004>
- Setzler, E. M., Boynton, W. R., Wood, K. V., Zion, H. H., Lubbers, L., Mountford, N. K., Frere, P., Tucker, L., & Mihursky, J. A. (1980). Synopsis of biological data on striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *FAO fisheries synopsis* no. 121; NOAA technical report NMFS CIRC 433. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/2955>
- Singh, A. K. (2013). Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 181, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.08.027>
- Schutz, J.R. and Harrell, R.M. (1999), Use of Sex Reversal in Striped Bass to Create an All-Male Population. *North American Journal of Aquaculture*, 61, 97-106. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(1999\)061<0097:UOSRIS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(1999)061<0097:UOSRIS>2.0.CO;2)

- Schulz, R. W., De França, L. R., Lareyre, J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2009). Spermatogenesis in fish. *General And Comparative Endocrinology*, 165(3), 390-411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>
- Smithsonian. (2025, febrero 27). *Morone saxatilis*. Smithsonian Environmental Research Center. https://invasions.si.edu/nemesis/species_summary/167680
- Rajendiran, P., Jaafar, F., Kar, S., Sudhakumari, C., Senthilkumaran, B., & Parhar, I. S. (2021). Sex Determination and Differentiation in Teleost: Roles of Genetics, Environment, and Brain. *Biology*, 10(10), 973. <https://doi.org/10.3390/biology10100973>
- Vandeputte, M., Clota, F., Sadoul, B., Blanc, M., Blondeau-Bidet, E., Bégout, M., Cousin, X., & Geffroy, B. (2020). Low temperature has opposite effects on sex determination in a marine fish at the larval/postlarval and juvenile stages. *Ecology and Evolution*, 10(24), 13825–13835. <https://doi.org/10.1002/ece3.6972>
- Williams, E., Peer, A., Miller, T. J., Secor, D. H., & Place, A. R. (2011). A phylogeny of the temperate seabasses (Moronidae) characterized by a translocation of the mt-nd6 gene. *Journal of Fish Biology*, 80(1), 110–130. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03158.x>
- Won, E. T., & Borski, R. J. (2013). Endocrine Regulation of Compensatory Growth in Fish. *Frontiers In Endocrinology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00074>
- Xu, H., Li, M., Gui, J., & Hong, Y. (2010). Fish germ cells. *Science China Life Sciences*, 53(4), 435-446. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-0058-8>

Anexos

Anexo A

Tabla 4. Solución fijadora Davidson

Preparación de un litro (1000 ml) de solución fijadora

Reactivo	Volumen (ml)
Formaldehido 37%	200
Etanol 96%	300
Glicerina	100
Agua de mar filtrada	300
Ácido acético	10

Anexo B**Tabla 5.** Solución descalcificadora

Preparación de 100 ml de solución descalcificadora.

Reactivo	Volumen (ml)
Ácido nítrico concentrado	5
Agua destilada	95

Anexo C**Tabla 6.** Proceso de deshidratación en procesador de tejidos

Reactivo	Tiempo en horas
Etanol 70%	1
Etanol 96%-I	2
Etanol 96%-II	2
Etanol 100%-I	2
Etanol 100%-II	2
Etanol 100%-III	1
Benceno I	2
Benceno II	2
Parafina I	2
Parafina II	2
Parafina III	2

Anexo D**Tabla 7.** Proceso de desparafinación de laminillas histológicas

Reactivo	Tiempo
Xileno I	8 minutos
Xileno II	8 minutos
Etanol 100%	15 inmersiones
Etanol 95%	15 inmersiones
Etanol 70%	15 inmersiones
Etanol 50%	15 inmersiones
Etanol 30%	15 inmersiones
Agua corriente	3 minutos

Anexo E

Tabla 8. Proceso de tinción con hematoxilina-eosina

Reactivo	Tiempo
Hematoxilina de Myers	7 minutos
Agua corriente	2 minutos
Alcohol acido (0.3ml HCl / Etanol 70%)	1 minuto
Agua corriente	2 minutos
Carbonato de litio	1 minuto
Agua corriente	2 minutos
Agua destilada	30 segundos
Etanol 96%	1 minuto
Eosina "Y"	30 segundos
Etanol 96%-I	10 inmersiones
Etanol 96%-II	10 inmersiones
Etanol 100%-I	15 inmersiones
Etanol 100%-II	15 inmersiones
Xileno-I	3 minutos
Xileno-II	5 minutos