

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN ACUICULTURA**



**“TRATAMIENTO ORAL CON LETROZOL, INHIBIDOR DE  
AROMATASA PARA LA MASCULINIZACIÓN DE ALEVINES DE  
TILAPIA GRIS (*Oreochromis niloticus*)”**

**Presentada por:**

**ELSA VICTORIA VEGA GALARZA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGÍSTER SCIENTIAE EN ACUICULTURA**

**Lima- Perú**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN ACUICULTURA**

**“TRATAMIENTO ORAL CON LETROZOL, INHIBIDOR, DE  
AROMATASA PARA LA MASCULINIZACIÓN DE ALEVINES DE  
TILAPIA GRIS (*Oreochromis niloticus*)”**

**Presentada por:**

**ELSA VICTORIA VEGA GALARZA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado evaluador**

**Dra. Marta Williams León de Castro  
PRESIDENTE**

**Dra. Patricia Gil Kodaka  
MIEMBRO**

**M.Sc. Aníbal Severo Verástegui Maita  
MIEMBRO**

**M.Sc. Beatriz Elena Angeles Escobar  
ASESORA**

## **DEDICATORIA**

*A mi familia: Por su amor y comprensión, Jaime mi compañero perfecto,  
Jaime Jesús y Domenica mis preciosos encargos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por su amor fiel y bendición constante.

A mi asesora M. Sc. Beatriz Angeles por su dirección, ánimo y estímulo para el logro de este trabajo.

A los miembros de jurado los profesores Martha, Patricia y Aníbal por el tiempo dedicado a la corrección y críticas necesarias para la culminación de esta investigación.

A María Cristina, Beatriz y Jessie, las amigas que me impulsaron constantemente al término de la tarea emprendida.

A los técnicos del Laboratorio de Acuicultura Wilfer y Raquel así como también a los alumnos Renzo, Gianela, Priscilla por su ayuda en las diferentes actividades de la etapa experimental.

A Iván por su apoyo en la evaluación estadística y a todos aquellos que de alguna forma me brindaron su ayuda desinteresada para la realización del presente trabajo.

Al CONCYTEC por el financiamiento de la investigación como parte del Proyecto Especial y al MINEDU por el apoyo económico para la adquisición de algunos materiales y la impresión de los ejemplares.

## INDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
2.1 PRODUCCIÓN DE TILAPIA MONOSEXO PARA LA ACUICULTURA	4
2.2 DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL	5
2.2.1 Determinación sexual en <i>O. niloticus</i>	6
2.2.2 Diferenciación sexual	7
2.2.3 Rol de los esteroides en la diferenciación sexual	9
2.3 MASCULINIZACIÓN DE TILAPIAS	10
2.3.1 Inversión sexual de tilapia por hormonas	10
2.3.2 Uso de hormonas en la inversión sexual	11
2.4 LA ENZIMA AROMATASA Y LOS INHIBIDORES DE AROMATASA	12
2.4.1 La aromatasa	12
2.4.2 Rol de la aromatasa en tilapia	13
2.4.3 Inhibidores de aromatasa	14
2.4.4 Letrozol	15
2.4.5 Inhibidores de aromatasa y masculinización de peces	16
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	20
3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	20
3.3 ANIMALES EXPERIMENTALES	21
3.4 DIETAS EXPERIMENTALES	22
3.5 UNIDADES EXPERIMENTALES	23
3.6 CONTROL DE PARÁMETROS AMBIENTALES	23

3.7 ETAPA EXPERIMENTAL	24
3.7.1 Primera fase	24
3.7.2 Segunda fase	26
3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL	27
3.8.1 Primera fase	27
3.8.2 Segunda fase	28
3.9 PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DATOS	28
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
4.1 EVALUACIÓN DE LAS DOSIS DE LETROZOL	30
4.1.1 Parámetros ambientales	30
4.1.2 Crecimiento y supervivencia con los diferentes tratamientos	34
4.1.3 Evaluación de la inversión sexual con diferentes dosis de letrozol	38
4.1.4 Descripción de gónadas con diferentes dosis de letrozol	42
4.2 EVALUACIÓN DE TIEMPOS DE APLICACION DEL TRATAMIENTO CON LETROZOL	50
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>56</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>57</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Experiencias de masculinización de peces mediante el uso de inhibidores de aromatasa (AI) por diversos autores.	18
<b>Tabla 2:</b> Valores promedio por tratamientos y controles de la temperatura, el oxígeno disuelto (mañana y tarde) y el pH (tarde) durante la fase experimental	30
<b>Tabla 3:</b> Temperatura promedio semanal (°C) por tratamientos (mañana y tarde)	32
<b>Tabla 4:</b> Concentración de Oxígeno Disuelto promedio semanal ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) por tratamientos (mañana y tarde)	33
<b>Tabla 5:</b> Variación del pH promedio semanal en los tratamientos y controles	34
<b>Tabla 6:</b> Crecimiento y supervivencia promedio de tilapia nilótica ( <i>O. niloticus</i> ) en evaluación de dosis de letrozol	35
<b>Tabla 7:</b> Resultados de la obtención de hembras, machos e intersexo con los diferentes tratamientos	38
<b>Tabla 8:</b> Resultados de la evaluación del sexo de peces sometidos a tratamiento con 50 mg de letrozol por Kg de alimento durante dos y tres semanas	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Representación del complejo sistema de la determinación sexual de la tilapia influenciada por tres factores: genéticos principales, genéticos menores y ambientales (la temperatura). Fuente: Baroiller 2009. 7
- Figura 2:** Representación esquemática del proceso de diferenciación gonadal en machos (XY) y hembras (XX) de *O. niloticus*, SPC: grupo de células productoras de esteroides, O: cistes de células germinales en profase meiótica, BV: vaso sanguíneo, ED: conducto eferente en formación. Fuente: Kobayashi *et al.* 2013. 8
- Figura 3:** Representación de algunas vías esteroidogénicas en las gónadas de peces y las principales enzimas entre ellas la P450 aromatasa en la síntesis de la estrona y 17 beta estradiol. Fuente: Baroiller *et al.* 1999. 13
- Figura 4:** Comparación de las estructuras químicas de los diferentes inhibidores de aromatasa, de los tipos I y II. Fuente: Bhatnagar 2007 15
- Figura 5:** Disposición de los tratamientos, controles y repeticiones durante la primera fase para la evaluación de dosis de letrozol en la masculinización de alevinos de tilapia gris. 28
- Figura 6:** Disposición de los tratamientos y repeticiones durante la segunda fase para la evaluación del tiempo de tratamiento con letrozol. 28
- Figura 7:** Curva de peso promedio semanal de alevinos de tilapia (*O. niloticus*) sometidos a diferentes dosis de letrozol y controles positivo y negativo 36
- Figura 8:** Variación del número de peces debido a la mortalidad por tratamientos y controles durante el periodo experimental (n inicial =130). 37
- Figura 9:** Observación microscópica en fresco de las gónadas de tilapia de individuos (A) machos, (B) hembras, (C) intersexo, 100X. 43
- Figura 10:** Observación microscópica de muestras histológicas de las gónadas de tilapia de individuos (A) machos, (B) hembras, (C) intersexo, 100X. 43
- Figura 11:** Cortes histológicos de gónadas masculinas de peces que recibieron dosis de letrozol (A,B,C), 17 alfa metilttestosterona (D) y ningún masculinizante (E) en el alimento durante 30 días. Cistos (c) 400X. 45



- Figura 12:** Cortes histológicos de gónadas masculinas con diferentes estadios de desarrollo de los peces sometidos a dosis de letrozol de  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento durante 30 días. A) estadio 1, B) estadio 2, C) estadio 3. Cisto (c), espermatozoides primarios (Epc I), espermatozoides (Epc), espermátides (Epm), espermatozoides (EZ), 400X. 46
- Figura 13:** Cortes histológicos de gónadas masculinas con diferentes estadios de desarrollo de peces sometidos a dosis de letrozol de  $200 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento durante 30 días. A) estadio 1, B) estadio 2, C) estadio 3. Cisto (c), espermatozoides primarios (Epc I), espermatozoides (Epc), espermátides (Epm), espermatozoides (Ez), 400X. 47
- Figura 14:** Cortes histológicos de gónadas femeninas de peces que recibieron dosis de letrozol de  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento (T1),  $17 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alfa metiltestosterona (T2) y sólo alcohol en el alimento (C0) durante 30 días. Oocitos en etapa nucleocromatínica (Onc), Oocitos etapa perinuclear (Opn), Oocitos pre vitelogénicos o etapa alveolo cortical (Opv), 400X. 48
- Figura 15:** Cortes histológicos de gónadas intersexo de peces del control  $17 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alfa metiltestosterona (C) y tratamiento con  $200 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento (T3). Oocito (Oo), tejido testicular (Tt), 400X. 50
- Figura 16:** Peces machos, hembras e intersexo (%) obtenidos con la adición de letrozol en el alimento ( $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) en diferentes tiempos de tratamiento. 51

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> Método de para la identificación del sexo de peces juveniles con el tinte Aceto Carmín. Adaptado de Guerrero y Shelton, 1974; Wassermann y Bertolla 2002.	65
<b>ANEXO 2:</b> Preparación de muestras de gónadas método Aceto - Carmín	67
<b>ANEXO 3:</b> Preparación de láminas histológicas.	68
<b>ANEXO 4:</b> Modelo lineal general	71
<b>ANEXO 5:</b> Prueba de proporciones	74

## RESUMEN

El presente trabajo muestra los resultados obtenidos en los experimentos con fines de masculinización de alevinos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) mediante el uso de un inhibidor de aromatasa, el letrozol, administrado en el alimento. Inicialmente se evaluaron tres dosis diferentes, administradas durante un periodo de tratamiento de 30 días. En un segundo experimento la masculinización fue evaluada administrando la menor dosis del inhibidor durante periodos de dos y tres semanas. Se evaluó el crecimiento, la supervivencia y el porcentaje de masculinización de los peces sometidos a 3 dosis de letrozol de 50 (T1), 100 (T2) y 200 (T3) mg.Kg<sup>-1</sup> alimento, un control negativo (C0) y un control positivo (C) con 60 mg.Kg<sup>-1</sup> alimento de 17 alfa metil testosterona (17 MT). El crecimiento (incremento en longitud y peso), así como la supervivencia de los peces no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, ni con los controles positivo y negativo. Los tratamientos T1, T2, T3 produjeron 90,100 y 93 por ciento de machos. Se obtuvo tres por ciento de hembras en T1 y siete por ciento de individuos intersexo en T1 y T3. El porcentaje de peces machos con las dosis de letrozol fue significativamente diferente al obtenido con el control positivo 17 MT y el control negativo. Los resultados de la masculinización con la dosis de letrozol de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento fueron 73 y 82 por ciento para los tratamientos de dos y tres semanas respectivamente, se demostró que la acción del inhibidor es dependiente de la dosis y del tiempo de administración. Se concluyó que el letrozol con dosis de 50 mg por kilogramo de alimento permite una masculinización de más del 90 por ciento de los alevinos de *O. niloticus*, con un tiempo de administración de 4 semanas.

Palabras clave: Inversión sexual, *Oreochromis niloticus*, inhibidor de aromatasa, masculinización, letrozol

## ABSTRACT

The present work shows the results obtained in the experiments for masculinizing tilapia fry (*O. niloticus*) by the use of an aromatase inhibitor letrozole administered in the ration. Initially three doses with a treatment period of 30 days. With the lower doses of the inhibitor a period of two and three weeks was performed in order to evaluate the masculinization rate. The tilapia fry were exposed to three levels of letrozole 50 (T1), 100 (T2) and 200 (T3) mg.Kg<sup>-1</sup> ration, a negative control (C0) and positive control (60 mg of 17 alpha methyl testosterone.Kg<sup>-1</sup> ration (MT); growth, survival and masculinization percentage were evaluated. No significant differences were found for growth (weight and length increase) and survival between treatments neither with negative and the positive control. The treatments T1, T2, T3 showed a production of males of 90, 100 and 93 percentage. And 3 percent of females in T1 and 7 percent of intersex in T1 and T3. Regarding masculinization, the effect of the evaluated doses was significantly different in the positive and negative controls. Treatment with letrozol 50 mg.Kg<sup>-1</sup> in ration gave 73 and 83 percentage males in two and three weeks, respectively, showing that the action of the inhibitor depends on dose and time. The conclusion is that 50 mg letrozol per kg of ration promotes masculinization of more than 90 percent of tilapia fry (*O. niloticus*) in four weeks of administration.

Keywords: Sex inversion, *Oreochromis niloticus*, aromatase inhibitor, masculinization, letrozole

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la tilapia en el país durante el periodo del 2006 al 2015 se incrementó de 494 a 3250 toneladas siendo la segunda especie, después de la trucha, de mayor producción en el ámbito continental (PRODUCE, 2015). La producción de tilapia es pequeña y está destinada a la venta interna y la exportación (46,3 y 53,7 por ciento respectivamente en el 2015), pero tiene un gran potencial para seguir incrementando su producción para cubrir la demanda de estos mercados. Su cultivo se ha extendido en zonas de clima tropical y subtropical (Piura, San Martín y Lima) pudiéndose desarrollar adecuadamente en selva alta y costa norte. La disponibilidad de áreas y tecnología de producción son una perspectiva interesante para el cultivo de la especie, sin embargo la informalidad de algunas empresas y la dificultad de acceder de forma estable al mercado exterior, entre otras causas, no ha contribuido a su crecimiento al ritmo de otras especies (PRODUCE, 2010). La producción de tilapias en el Perú requiere de la disponibilidad de semilla de calidad que permita al productor desde un inicio obtener un producto estandarizado que satisfaga las exigencias del mercado, los pequeños productores muchas veces se enfrentan a la dificultad de acceder a insumos más económicos y de mejor calidad así como a nuevas tecnologías debido a los costos altos que ello implica.

El cultivo de esta especie es principalmente de individuos sólo machos debido a las características de mayor crecimiento y uniformidad de tamaños que cuando se realizan cultivos con ambos sexos (Rutten *et al.* 2005 citado por Macintosh, 2010). La técnica disponible comercialmente para producir alevinos machos es la de inversión sexual con el uso de la hormona 17 alfa metiltestosterona (MT) adicionada en el alimento antes de la diferenciación sexual, con resultados de hasta el 100 por ciento de individuos machos. El protocolo de uso de la hormona está bien documentado para la producción comercial de tilapia monosexo, éste incluye dosis entre 40 - 60 mg Kg<sup>-1</sup> de alimento suministrada durante 30 días de tratamiento a alevines no diferenciados sexualmente

(con menos de 13 mm de longitud total) (Popma y Green 1990) sin embargo; presenta algunas desventajas como la degradación de la hormona durante el almacenamiento y en el tracto digestivo, falta de uniformidad de la hormona en el alimento y jerarquías entre los peces que causan variación en las dosis individuales. Si además no se siguen las directrices relacionadas particularmente a la frecuencia y el momento de la alimentación, el tratamiento puede no ser muy eficiente disminuyendo el porcentaje de machos obtenidos, como suele pasar en algunos centros de producción comercial (Beardmore 2001).

Diversas razones motivan a realizar investigaciones en el uso de otros métodos alternativos de masculinización de alevines de tilapia, entre ellas la dificultad de la adquisición de la hormona en el país, la no formalidad de su comercialización y el incremento a futuro de la demanda de esta hormona para la producción de semilla a mayores escalas. Si bien estudios realizados indican que no hay riesgo asociado a MT para el consumidor, y no se conocen riesgos para los acuicultores y al medio ambiente (Macintosh 2010), es necesario implementar las buenas prácticas para el uso de MT en actividades de acuicultura, como medida precautoria. La producción de tilapia a pequeña escala se abastece de semilla proveniente de los centros de producción autorizados, aunque se conoce que existen productores que se autoabastecen de alevinos, estas producciones muchas veces no cumplen con los protocolos exigidos para el manejo responsable de la hormona ya sea por desconocimiento de la técnica o falta de asesoramiento, incrementándose el riesgo y problemas relacionados a su uso no adecuado. Por otro lado, otra motivación para la adopción de técnicas que no empleen hormonas esteroides es el incremento de la exigencia del mercado consumidor de productos “más sanos”, lo cual obliga a los acuicultores a emplear sistemas de producción que aseguren la inocuidad del producto así como el cuidado del medio ambiente. Por lo mencionado es necesario contar con métodos de masculinización de aplicación práctica, efectiva y segura.

Varios trabajos fueron realizados con la finalidad de evaluar otros métodos de masculinización para la producción comercial de alevinos, entre ellos métodos directos e indirectos, uso de anti estrógenos, inhibidores enzimáticos, sustancias esterilizantes, feminización de machos para la producción de super machos, hibridación, manipulación de factores ambientales, etc., sin embargo pocos han logrado resultados como los de la

masculinización mediante la hormona 17 alfa metil testosterona la cual permite una producción comercial de forma extendida (Bombardelli *et al.* 2004).

El uso de inhibidores enzimáticos como es el caso de los inhibidores de aromatasa (IA) ha sido reportado en numerosos estudios relacionados a la investigación de la actividad del complejo citocromo P450 aromatasa (P450arom) y su importancia en la diferenciación gonadal de los peces; sin embargo aún no es factible de aplicarlo a escala comercial debido a la falta de protocolos que definan dosis efectivas, tiempos de administración, efectos residuales en los peces y el medio ambiente, etc. por lo que no pueden ser empleados de manera eficiente y a bajos costos. El letrozol es una sustancia disponible en el mercado nacional y con antecedentes de su uso en peces y otros vertebrados (Gao *et al.* 2010), por lo que puede ser usada para la masculinización de alevinos de tilapia ya que actúa en una de las rutas metabólicas hormonales existentes en peces durante el proceso de diferenciación de las gónadas en desarrollo, reduciendo la producción de estrógenos (Steele *et al.* 1987 citados por Gao *et al.* 2010); sin embargo los resultados pueden variar principalmente al relacionarlos con el incremento de la dosis, el tiempo de tratamiento y la forma de administración.

Es en este contexto que se planteó el presente trabajo sobre la utilización del letrozol, un inhibidor de aromatasa (AI) en la producción de alevinos machos de tilapia gris o del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo General, determinar la dosis y tiempo adecuado de tratamiento oral del inhibidor de la enzima aromatasa (IA) letrozol, con el propósito de lograr la masculinización de alevinos de tilapia *Oreochromis niloticus* durante la etapa de diferenciación sexual.

Objetivos Específicos, evaluar la eficiencia de la masculinización (porcentaje de machos) de diferentes dosis del letrozol, evaluar la relación dosis - tiempo de administración, evaluar la sobrevivencia y el crecimiento durante el tratamiento y comparar el efecto del letrozol versus la hormona 17 alfa metiltestosterona (MT) en la masculinización.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 PRODUCCIÓN DE TILAPIA MONOSEXO PARA LA ACUICULTURA

El cultivo de poblaciones de peces de un solo sexo es una necesidad para algunos sistemas de producción acuícola, su uso presenta ventajas como tasas de crecimiento promedio más altos, control de la reproducción, reducción de la conducta sexual y territorialidad, uniformidad de tamaños en la cosecha y disminución del riesgo de impacto ambiental por los escapes de peces exóticos (Beardmore *et al.* 2001).

En acuicultura es ideal que los peces criados no se reproduzcan en los estanques antes de alcanzar los pesos comerciales. Esta condición es el desafío que se tiene que enfrentar en la producción de tilapias ya que las especies comerciales entre ellas la *O. niloticus* alcanzan la madurez con pesos menores a los 100 g y bajo condiciones adecuadas pueden continuar reproduciéndose con la consecuente competencia por el alimento y espacio entre las crías y los peces inicialmente introducidos, como resultado de esta situación no se tiene uniformidad de tamaños en el lote y los pesos promedio en la cosecha son menores a los 100 g (Phelps y Popma 2000), razones por las que es preferible el cultivo de tilapias sólo machos. El riesgo de un bajo crecimiento de los peces durante el cultivo está directamente relacionado al número de hembras que ingresan a los estanques y el tiempo que dure el ciclo de producción, recomendándose como regla general aceptar entre el 7 a 10 por ciento de hembras si los cultivos son de poca duración (3 meses), de 3 a 5 por ciento en cultivos de 5 meses, de 1 a 2 por ciento si el ciclo es de 7 meses y ninguna hembra en producciones con una duración mayor a 10 meses (Popma y Green 1990).

Las diferencias en el crecimiento entre machos y hembras pueden estar asociadas a la canalización de la energía del crecimiento somático hacia la producción de huevos en



las hembras, los efectos anabólicos de los esteroides sexuales masculinos y hormonas de crecimiento, los genes vinculados a la determinación del sexo, la actividad de alimentación reducida de las hembras durante la reproducción (Toguyeni *et al.* 2002), asimismo los machos presentan mejores tasas de conversión alimenticia, alta supervivencia y significativamente mayor producción que las hembras en líneas mejoradas y no mejoradas (Rhida 2011).

Por lo mencionado la producción de poblaciones monosexo de machos de tilapias viene aplicándose, obteniéndose mejores ciclos de producción e incremento de la rentabilidad a diferencia de los cultivos mixtos.

Los avances en la investigación sobre los mecanismos de determinación y diferenciación sexual en peces han permitido incrementar el conocimiento para mejorar el control del sexo en las poblaciones de los peces de cultivo, por lo cual es necesario hacer una revisión de estos conceptos.

## **2.2 DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL**

La expresión o manifestación del sexo depende de dos procesos: la determinación y la diferenciación sexual. La determinación del sexo es responsable del sexo genético (también llamado genotípico), mientras que la diferenciación sexual es responsable del desarrollo de distintos tipos de gónadas, testículos u ovarios (el sexo gonadal o fenotípico) (Piferrer 2001). Ambos procesos determinan la proporción de machos y hembras en las poblaciones de peces. Explicado de otra forma la determinación del sexo es el proceso genético o ambiental que establece el sexo (género) de un organismo, mientras que la diferenciación sexual es el proceso por el cual una gónada indiferenciada se transforma en un ovario o un testículo (Penman y Piferrer 2008). Algunos autores prefieren no hacer distinción entre estos procesos y se refieren a ambos como un proceso continuo del desarrollo sexual, ya que la división clásica entre los dos términos puede ser demasiado estricta para la mayoría de las especies de peces debido a la plasticidad observada en su desarrollo sexual (Uller y Helanterä 2011) ya que el sexo de un individuo se puede determinar genéticamente, pero la formación de

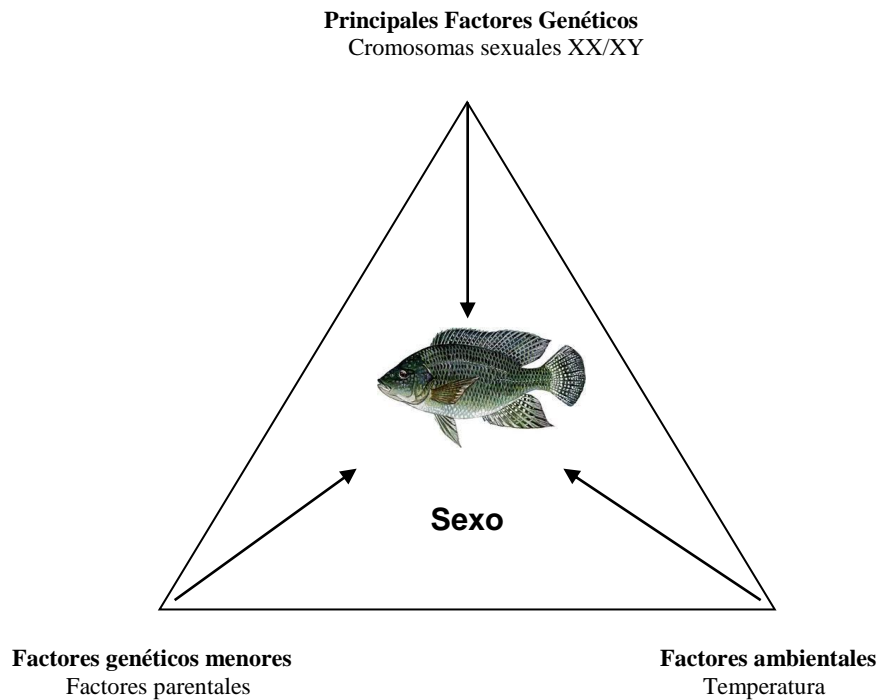
gónadas, es influenciada por factores ambientales o incluso el sexo en los peces puede ser reversible funcionalmente (Paul-Prasanth *et al.* 2013).

### **2.2.1 DETERMINACIÓN SEXUAL EN *O. niloticus***

La tilapia *O. niloticus* es una especie gonocórica cuya determinación del sexo es un sistema complejo, que está influenciado por tres factores: la determinación del sexo genética (DSG) por los cromosomas sexuales XX / XY, los factores genéticos menores (heredados de los padres) y la temperatura como el factor ambiental, como lo representa la Figura 1.

Diversos trabajos han comprobado que *O. niloticus* tiene un sistema de determinación genética del sexo con cromosomas XX/XY similar a la de los mamíferos (Jalabert *et al.*; Müller-Belecke y Hörstgen-Schwark, mencionados por Baroiller *et al.* 2009), con individuos machos heterogaméticos XY y hembras monogaméticas XX. Al respecto las investigaciones han sido conducidas para identificar el gen de la determinación del sexo en diversas especies de tilapias, identificándose varios genes candidatos y el locus determinante del sexo (Peichel *et al.*; Kikuchi *et al.*; Tripathi *et al.*; Ser *et al.* mencionados por Kobayashi *et al.* 2013). Los resultados experimentales han mostrado grandes desviaciones en las proporciones de los sexos en la tilapia del Nilo indicando que la determinación del sexo en esta especie no puede ser explicada mediante un simple modelo monofactorial, la determinación del sexo no es controlada exclusivamente por los cromosomas sexuales sino que también está influenciada por factores localizados en autosomas (Baroiller y Toguyeni 2004).

Los mismos autores reportan que la temperatura es el factor ambiental más importante en la determinación sexual de *O. niloticus*, induciendo a la diferenciación testicular a temperaturas altas (34-35 °C) cuando los tratamientos son realizados dentro del periodo de termo sensibilidad (no más de 13 días pos fecundación o 351 grados día) en algunas progenies.



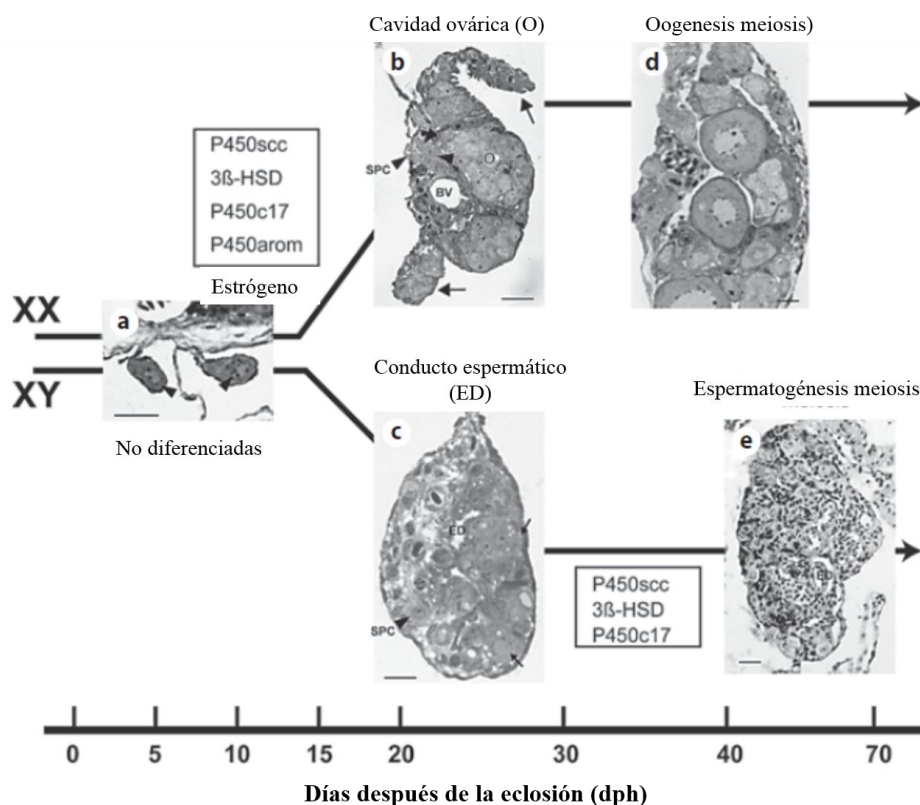
**Figura 1: Representación del complejo sistema de la determinación sexual de la tilapia influenciada por tres factores: genéticos principales, genéticos menores y ambientales (la temperatura). Fuente: Baroiller 2009**

### **2.2.2 DIFERENCIACIÓN SEXUAL**

En las especies gonocóricas diferenciadas como es el caso de la tilapia del Nilo el desarrollo gonadal temprano se da formando ovarios o testículos a partir de una gónada indiferenciada (Devlin y Nahagama 2002). La diferenciación sexual abarca todos los eventos que tienen lugar en la gónada primordial, estos incluyen la migración de células germinales primordiales, el establecimiento de crestas gonadales y la diferenciación de las gónadas en testículos u ovarios (Brusle y Brusle, mencionados por Piferrer 2001).

Kobayashi *et al.* (2013) describen el proceso de diferenciación sexual en *O. niloticus*, el cual es ilustrado en la Figura 2, desde el día de la eclosión cuando las células germinales primordiales (PGCs), que son morfológicamente distinguibles de las células somáticas, se localizan en el mesodermo que rodea la parte posterior del tracto digestivo. A los tres días posteriores a la eclosión (siete días pos fecundación), las PGCs migran hacia el primordio gonadal después de la formación de la cavidad celómica en el

mesodermo lateral (Figura 2a). A los nueve días después de la eclosión (trece dpf), las células germinales femeninas XX proliferan (mitosis), mientras que el número de células germinales no cambia en las gónadas masculinas XY hasta el día catorce después de la eclosión (dieciocho dpf). La morfogénesis del tejido somático en las gónadas XX y XY no es aparente hasta varios días después. Los primeros signos de diferenciación gonadal aparecen a 20 y 25 días después de la eclosión, con la cavidad ovárica o el conducto eferente intratesticular en el ovario y el testículo respectivamente (Figuras 2b y 2c). La oogenénesis se desarrolla en los ovarios entre los días 25 y 30 después de la eclosión (Figura 2 d), a diferencia de la espermatogénesis que se inicia entre los 50 y 70 días (Figura 2e). La figura también señala el conjunto de enzimas que intervienen en este proceso. Es importante señalar que la diferenciación de las gónadas de las hembras se inicia antes que las de los machos y el periodo lábil de la diferenciación sexual, es decir el periodo de tiempo sensible o ventana en el cual las gónadas experimentan la diferenciación, está entre los cinco y diez días pos eclosión.



**Figura 2: Representación esquemática del proceso de diferenciación gonadal en machos (XY) y hembras (XX) de *O. niloticus*, SPC: grupo de células productoras de esteroides, O: cistas de células germinales en profase meiótica, BV: vaso sanguíneo, ED: conducto eferente en formación. Fuente: Kobayashi *et al.* 2013.**

### 2.2.3 ROL DE LOS ESTEROIDES EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Los esteroides producidos por los tejidos gonádicos han sido propuestos como los factores responsables de la aparición de la diferenciación sexual en muchas especies de peces, incluyendo *O. niloticus*. Las células foliculares alrededor del oocito y las células de Leydig del tejido intersticial en el testículo son los principales responsables de la producción de esteroides sexuales en los tejidos sexuales (Nagahama *et al.* citados por Devlin y Nagahama 2002). En los peces teleósteos, los esteroides sexuales afectan el desarrollo de células germinales y otros tipos de células, así como los órganos implicados en la diferenciación sexual (Devlin y Nagahama 2002).

Los controles genéticos de la síntesis de esteroides que desencadenan la diferenciación sexual se han atribuido a la expresión de las enzimas esteroidogénicas.

El esteroide 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) es considerado el responsable de inducir y mantener el desarrollo ovárico, sus niveles son considerablemente más altos en las hembras que en los machos. El desarrollo testicular está regulado principalmente por el andrógeno 11-ketotestosterona (11KT). En los peces en general, la testosterona no está directamente involucrada en los mecanismos de diferenciación sexual, sino que participa como precursora del 11-KT y del 17 $\beta$ -estradiol (Nakamura *et al.* 1998; Baroiller *et al.* 1999).

En varias especies de teleósteos, como la tilapia y la trucha arco iris, una correlación entre la aparición de células esteroidogénicas y gonadales sugiere que los esteroides sexuales probablemente juegan un papel importante en la diferenciación sexual gonadal (Nakamura y Nagahama 1989; Al 2007). Actualmente se acepta que las hormonas esteroides sexuales juegan un papel crucial durante el proceso de diferenciación sexual en los peces, principalmente en la regulación de este proceso (Guiguen *et al.* 1999; Baroiller y Guiguen 2001). Según Bogart (1987) y Baroiller *et al.* (1999) la diferenciación sexual depende del equilibrio entre 11KT y 17 $\beta$  - estradiol; de tal manera que el exceso de 11KT induce la diferenciación masculina, mientras que el exceso de 17 $\beta$ -estradiol induce la diferenciación femenina. Esto se ha observado en varias especies de teleósteos (Rougeot *et al.* 2007).

## **2.3 MASCULINIZACIÓN DE TILAPIAS**

El cambio del sexo fenotípico de los peces es posible debido a la plasticidad y flexibilidad de su diferenciación sexual, mediante la manipulación de factores genéticos, hormonales o ambientales (Pandian y Sheela 1995).

Diversas técnicas han sido desarrolladas para la obtención de poblaciones de peces de un solo sexo como: el sexado manual (Guerrero 1982), hibridación (Hickling 1960), control genético para la producción de machos YY (Mair *et al.* 1997), inversión sexual mediante la administración de hormonas (Phelps y Popma 2000), masculinización por temperaturas altas (Bearnmore *et al.* 2001). El método de la inversión sexual por la administración de andrógenos, principalmente 17 alfa metil testosterona, es el más ampliamente usado en acuicultura debido a su fácil aplicación y eficacia (Cnaani y Levavi-Sivan 2009).

### **2.3.1 INVERSIÓN SEXUAL DE TILAPIA POR HORMONAS**

Como se mencionó la técnica más común para la producción de poblaciones mono sexo es la inducción a la inversión sexual mediante el uso de esteroides, que consiste en la administración de andrógenos o estrógenos sintéticos a los peces indiferenciados durante el período lábil (Pandian y Sheela; Nakamura *et al.*; Strssmann y Nakamura, citados por Gao, 2010) durante este proceso la gónada indiferenciada es dirigida hacia un sexo en particular (Green *et al.* 1997) y que erróneamente se le conoce como reversión sexual.

Diversos esteroides naturales o sintéticos pueden ser empleados mediante su adición al alimento o por inmersión (Pandian y Sheela 1995). La administración en el alimento es de más fácil aplicación. La hormona es disuelta en alcohol y esta solución es mezclada con el alimento y luego éste es secado para permitir que el alcohol se evapore. Por otro lado los tratamientos por inmersión presentan la ventaja de poder ser aplicados antes del inicio de la alimentación exógena cuando el período lábil coincide con los estados embrionarios o larvarios como el caso de algunos salmónidos (Piferrer 2001).

El periodo lábil o sensible para la inversión sexual cubre el periodo de diferenciación gonadal y para que los tratamientos sean más eficaces éstos deben empezar antes de los

primeros signos histológicos de diferenciación de las gónadas (Hunter y Donaldson 1983; Hiott y Phelps 1993). Para la inversión sexual de tilapia se utiliza el andrógeno 17 alfa metiltestosterona aplicado en el alimento a partir de los 10 días después de la fecundación por un periodo de 3 a 4 semanas, las concentraciones varían entre 40 a 60 mg .kg<sup>-1</sup> de alimento obteniéndose hasta el 100 por ciento de individuos machos (Phelps y Popma 2000).

El tratamiento hormonal no altera el genotipo de los peces, pero dirige la expresión del fenotipo. Una población de peces puede ser fenotípicamente monosexo, pero genéticamente se ha mantenido igual como se determina en el momento de la fecundación.

### **2.3.2 USO DE HORMONAS EN LA INVERSIÓN SEXUAL**

El método desarrollado para el uso de andrógenos en la dieta es relativamente fácil de aplicar pero presenta una serie de desventajas. La hormona puede degradarse durante el almacenamiento y en su paso a través del tracto digestivo o puede que la hormona no esté distribuida uniformemente en el alimento y/o las jerarquías entre los peces causen una variabilidad en las dosis individuales que los peces reciben durante el tratamiento. Asimismo la aplicación de dosis excesivas de algunas hormonas puede conducir a la esterilidad o feminización debido a la aromatización de los andrógenos a estrógenos (Beardmore *et al.* 2001). Green y Teichert-Coddington (2000) reportaron los resultados del uso de MT para la inversión del sexo de la tilapia durante sus primeras etapas post larvales concluyendo que no presenta ningún efecto negativo para la seguridad alimentaria humana. Sin embargo, aunque la evidencia para la eliminación rápida de la hormona es buena, la evidencia de que los 20 o más derivados de la biotransformación también son eliminados rápidamente no es muy clara (Cravedi *et al.* 1993).

Macintosh (2010) propone buenas prácticas para establecimientos comerciales de producción intensiva de tilapia monosexo. Cuando los protocolos son rigurosamente seguidos, las técnicas comerciales de inversión del sexo pueden ser eficaces, pero el incumplimiento de las directrices relativas a la frecuencia y la alimentación en particular puede dar lugar a fallas que se observan comúnmente en los criaderos. Las preocupaciones persisten sobre la seguridad de los tratamientos comerciales de

inversión sexual tanto en lo que respecta a la seguridad del acuicultor y del consumidor, junto con los posibles impactos ambientales. Estas preocupaciones sobre la salud y el medio ambiente no han sido necesariamente abordadas adecuadamente y ahora que las granjas comerciales se han incrementado y donde la 17  $\alpha$ -metiltestosterona se aplica en cantidades relativamente altas, estas preocupaciones deben considerarse de manera responsable (Beardmore *et al.* 2001)

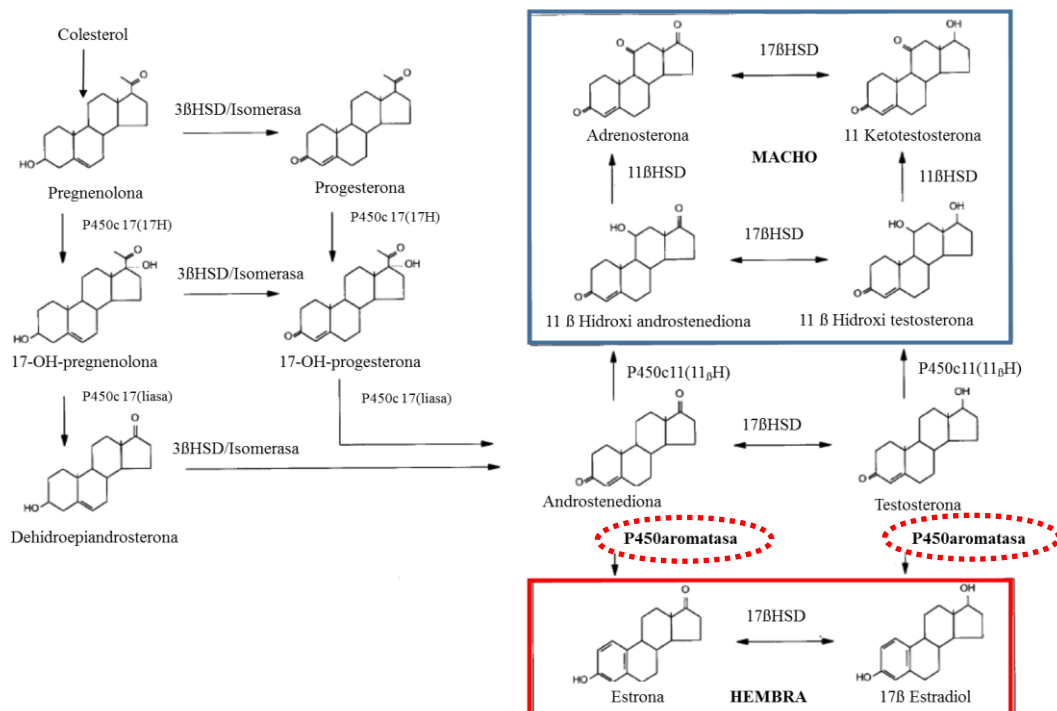
## **2.4 LA ENZIMA AROMATASA Y LOS INHIBIDORES DE AROMATASA**

### **2.4.1 LA AROMATASA**

La enzima CYP19, la cual también es conocida como P450arom o aromatasa, cataliza la formación de estrógeno con 18 C a partir del andrógeno con 19 C, es la enzima esteroidogénica terminal en la ruta de la biosíntesis del estrógeno (Figura 3). El gen que codifica la CYP19 ha sido clonado y caracterizado en peces como la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Chang *et al.* 1997), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mikiss*) (Tanaka *et al.* 1992), la carpa (*C. carpio*) (Barney *et al.* 2008) el gurami azul (*Trichogaster trichopterus*) (Ezagouri *et al.* 2008), el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Trant 1994), el pez cebra (*Danio rerio*) (Chiang *et al.* 2001) y la anguila (*Monopterus albus*) (Yu *et al.* 2008). La CYP19 mRNA es expresada principalmente en las gónadas, glándula pituitaria y el cerebro (Callard *et al.*; Callard y Tchoudakova; Goto-Kazeto *et al.*; Melo y Ramsdell citados por Uno *et al.* 2012).

Los peces teleósteos tienen dos isoformas de P450 arom que son productos de diferentes genes originados por la duplicación de un gen ancestral. Una isoforma se localiza principalmente en la gónada y se conoce como aromatasa gonadal, P450aromA o CYP19a, y la otra principalmente localizada en el cerebro y denominada aromatasa cerebral o neural, P450aromB o CYP19b (Piferrer *et al.* 2005). La CYP19a mRNA principalmente es expresada en la gónadas y tiene un rol importante en la diferenciación del sexo y en el crecimiento de los oocitos mientras que la CYP19b mRNA es expresada en el cerebro (Barney *et al.*; Kishida y Callard; Kobayashi *et al.*; Rasheeda *et al.* citados por Uno *et al.* 2012).





**Figura 3: Representación de algunas vías esteroidogénicas en las gónadas de peces y las principales enzimas entre ellas la P450 aromatasa en la síntesis de la estrona y 17 beta estradiol. Fuente: Baroiller *et al.* 1999.**

## 2.4.2 ROL DE LA AROMATASA EN TILAPIA

En la tilapia *O. niloticus*, la expresión del gen de la aromatasa, tanto en cerebro como en gónada, ocurre alrededor de los 3-4 días después de la fecundación (dpf), mientras que el inicio de la diferenciación sexual en las gónadas 20 días después (27-30 dpf) (Kwon *et al.* 2001), lo que apoyaría la teoría del cerebro como primer sitio de aromatización. Los estudios inmunohistoquímicos realizados en gónadas de tilapia mostraron que en las hembras todas las principales enzimas esteroidogénicas, incluyendo CYP19a, están presentes antes del inicio de la diferenciación sexual, en cambio, en los machos su detección es posterior excepto la CYP19a la cual no pudo ser detectada (Nakamura *et al.* 1998).

D'Cotta *et al.* (2001) evaluaron la expresión génica de la aromatasa durante la diferenciación sexual natural de hembras y machos genéticamente a 27°C y 35°C. Los resultados revelaron una fuerte expresión durante la diferenciación ovárica así como altos niveles de estradiol 17 b (E2) después de la diferenciación ovárica. Los machos

genéticos mostraron niveles más bajos de aromatasa y E2. La actividad de la aromatasa en el cerebro fue alta en las hembras y baja en los machos. También se encontró que la actividad cerebral de la aromatasa disminuyó casi tres veces en las hembras genéticas con temperatura de masculinización, así como en los machos genéticos a 35°C. Los autores concluyeron que la represión de la aromatasa en la gónada es necesaria (y tal vez en el cerebro) con el fin de conducir la diferenciación hacia el desarrollo del testículo.

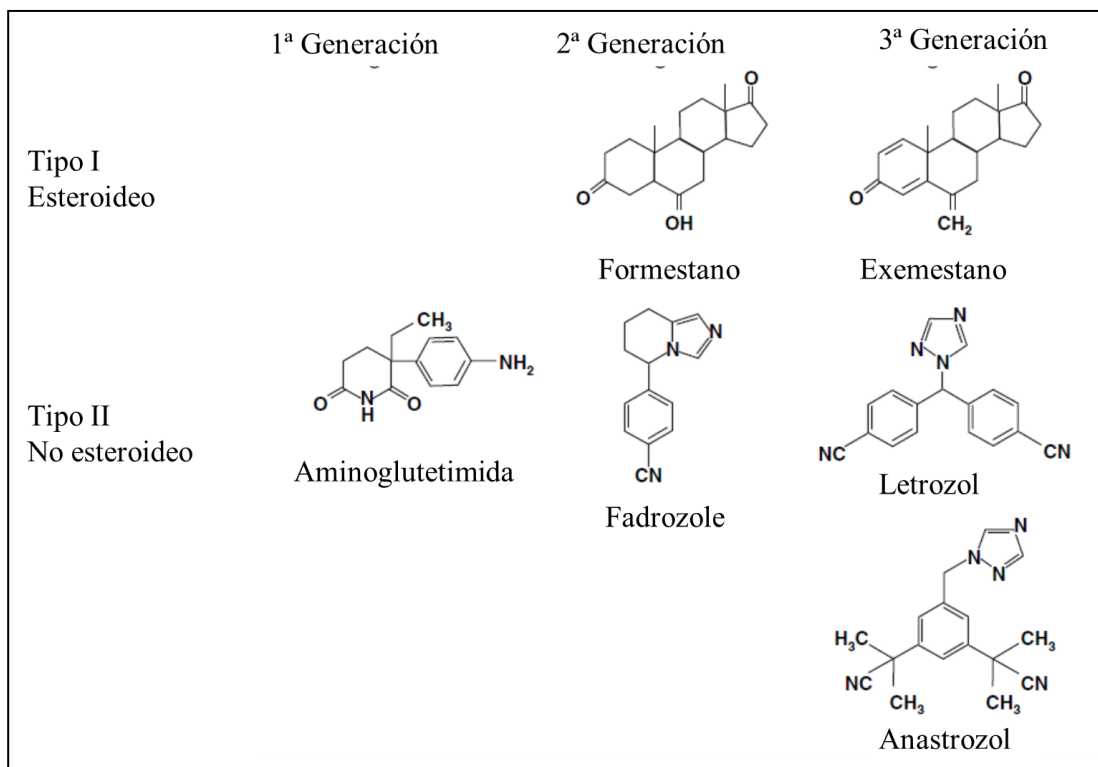
### **2.4.3 INHIBIDORES DE AROMATASA**

Los inhibidores de la aromatasa (IA) son compuestos que inhiben la actividad de la enzima aromatasa la cual cataliza la biosíntesis del estradiol 17 b (E2) a partir de su precursor la testosterona disminuyendo por lo tanto la producción de estrógenos (Steele *et al.* 1987). Estos fármacos han sido desarrollados teniendo en consideración el papel del estrógeno en el cáncer de mama (células con receptores de estrógeno positivo), lo cual ha llevado a estrategias terapéuticas dirigidas a inhibir la síntesis de estrógenos.

Estos compuestos han sido agrupados en: (a) tres generaciones que representan diferentes etapas de evolución asociadas con el incremento de selectividad y potencia y (b) dos tipos I y II en base a su mecanismo de inhibición.

La primera generación de inhibidores comenzó con la búsqueda de potentes y selectivos inhibidores de aromatasa, la aminoglutetimida la cual carecía de selectividad exclusiva para la aromatasa inhibiendo además la biosíntesis del cortisol, la aldosterona y la hormona tiroidea. Los de segunda generación incluyeron el inhibidor no esteroideo fadrozol y el inhibidor esteroideo formestano (4-hidroxiandrostenediona). El fadrozol fue superior a aminoglutetimida en términos de potencia, selectividad y seguridad, pero su selectividad no fue completa. La tercera generación de inhibidores tuvo en cuenta el enfoque de estructura-actividad para el diseño de fármacos logrando selectividad y potencia. Se mencionan en esta categoría los compuestos no esteroideos anastrozol, letrozol y el agente esteroideo exemestano (Bhatnagar 2007).

Los IA tipo I o inactivadores esteroideos, por ejemplo el exemestano, compiten con el sustrato natural al unirse al sitio catalítico de la enzima, interfieren en la formación del



**Figura 4: Comparación de las estructuras químicas de los diferentes inhibidores de aromatasa, de los tipos I y II. Fuente: Bhatnagar 2007**

complejo enzima-sustrato tras su unión covalente altamente estable, inactivando irreversiblemente la enzima. Los del tipo II inhibidores no esteroideos, se unen reversiblemente al sitio activo de la enzima, esta acción se mantiene mientras la concentración del inhibidor sea suficiente para tener ocupado el sitio de unión enzimático, por ejemplo el letrozol y el anastrozol (Haynes *et al.* mencionados por Bhatnagar 2007) (ver Figura 4)

#### 2.4.4 LETROZOL

El letrozol es un inhibidor no esteroideo altamente potente y selectivo que inhibe la actividad enzimática de la aromatasa intracelular en los sitios principales donde se encuentra, dando como resultado una supresión casi completa de la aromatización de todo el cuerpo. Su principio activo es 4,40- [(1H-1, 2,4-triazol-1-il)- metilen] bis-benzonitrilo con la formula  $C_{17}H_{11}N_5$  y de peso molecular de 285,303 g/mol. Actualmente es utilizado en el tratamiento de cáncer de mama y es un medicamento autorizado por Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID) en

el país, es comercializado con el nombre de Femara, Losiral, Letrozol (DIGEMID 2011).

La estructura química del letrozol se muestra y se compara con otros IA en la Figura 4. Las estructuras que contienen nitrógeno como los imidazoles y los triazoles se unen al hierro en el grupo hemo, mientras que el grupo cianobencilo presente en el letrozol imita parcialmente el esqueleto esteroide de la androstenediona, el sustrato natural de la enzima.

El letrozol inhibe el crecimiento o induce la regresión de tumores de mama que responden a las hormonas in vivo. El estrógeno está implicado como un factor de riesgo importante en la mayoría de los cánceres de mama; por lo tanto, el uso del inhibidor más potente es una estrategia lógica de tratamiento. Los estudios realizados utilizando modelos in vitro e in vivo han demostrado que letrozol es el más potente de la tercera generación de los inhibidores de aromatasa (Bhatnagar 2007), es capaz de inhibir el 98-99 por ciento de la actividad de la aromatasa y la reducción de las concentraciones séricas de estrona y E2 por debajo del límite de detección en pacientes humanos (Smith 1999).

#### **2.4.5 INHIBIDORES DE AROMATASA Y MASCULINIZACIÓN DE PECES**

Los inhibidores enzimáticos como es el caso de los inhibidores de aromatasa (IA) han sido empleados en numerosos estudios relacionados a la investigación de la actividad del complejo citocromo P450 aromatasa (P450arom). La importancia de la enzima en la diferenciación gonadal de los peces ha sido demostrada en varios estudios utilizando tratamientos con inhibidores de la aromatasa (IA) (Kwon et al. 2000; Afonso *et al.* 2001). Estos estudios demostraron que los IA pueden inhibir la actividad de la enzima aromatasa mediante la catalización de la biosíntesis de estradiol-17b (E2) a partir de su precursor de testosterona y el resultado puede reducir la producción de estrógenos (Steele *et al.* citados por Gao *et al.* 2010).

Como una alternativa al uso de hormonas esteroides, se ha experimentado con inhibidores enzimáticos, en la Tabla 1 se resume las diferentes experiencias con

inhibidores de aromatasa en peces. Los resultados de estas experiencias son variadas, en algunos casos se relaciona la respuesta con el incremento de la dosis, tiempo de tratamiento y forma de administración.

Los resultados más concluyentes se han obtenido con dos inhibidores de la aromatasa no esteroideos: fadrozole y letrozol. Los tratamientos con estos compuestos han logrado la masculinización de muchos animales no mamíferos, incluidos los peces teleósteos, tales como el salmón chinook *Oncorhynchus tshawytscha* (Piferrer, *et al.* 1994), la tilapia gris *Oreochromis niloticus* (Kwon *et al.* 2000), el pez cebra *Danio rerio* (Fenske y Segner 2004) y la quimera dorada *Siganus guttatus* (Komatzu *et al.* 2006).

También se reportó su uso en peces hermafroditas con fines de reversión sexual de las hembras, así como también la evaluación del efecto en el desarrollo gonadal, nivel de esteroides en el plasma y la actividad de la aromatasa en hembras de dos años de edad del *Epinephelus akaara* durante la época reproductiva (Li *et al.* 2005). Por otra parte, se reportó que el letrozol fue más potente que el fadrozole en la masculinización de las gónadas de tortugas (Dorizzi, *et al.* citados por Gao *et al.* 2010).

**Tabla 1: Experiencias de masculinización de peces mediante el uso de inhibidores de aromatasa (AI) por diversos autores.**

<b>Especie</b>	<b>Inhibidor</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Eficiencia masculinización</b>	<b>Referencia</b>
<i>Oreochromis niloticus</i>	Fadrozole	7–37 días pos eclosión, 200 - 500 mg kg <sup>-1</sup>	92.5–96.0 %	Kwon <i>et al.</i> 2000
<i>Oreochromis niloticus</i>	Fadrozole	9-15 y 9- 30 días pos eclosión (0, 50, 75 y 100 mg kg <sup>-1</sup> )	75 y 100 mg kg <sup>-1</sup> por 30 días 100 %	Afonso <i>et al.</i> 2001
<i>Siganus guttatus</i>	Fadrozole	30 y 90 días 500 µg.g <sup>-1</sup>	Interrupción de la formación cavidad ovárica y formación de testículos	Komatzu <i>et al.</i> 2006
<i>Oreochromis spp</i>	Letrozol y Exemestano	4-30 días pos eclosión, 25 y 100 mg kg <sup>-1</sup>	No diferencias entre dosis 100 mg kg <sup>-1</sup> alim y MT	Betancur <i>et al.</i> 2009
<i>Lepomis macrochirus</i>	Letrozol	30 - 90 días pos eclosión (50, 150, 250 y 500 mg kg <sup>-1</sup> alim.). Tratamiento de inmersión (250, 500 y 1000 ug.L <sup>-1</sup> ) durante 30 y 50 días pos eclosión.	Interrupción de la formación cavidad ovárica en dosis de 500 mg kg <sup>-1</sup> alim. Dosis de 500 y 1000 ug.L <sup>-1</sup> mayores proporciones de machos que el control y 250 ug.L <sup>-1</sup>	Gao <i>et al.</i> 2010
<i>Oreochromis niloticus</i>	Exemestano	9-35 días pos eclosión (1000 y 2000 µg g <sup>-1</sup> alim.)	Completa diferenciación testicular, 1000 µg g <sup>-1</sup> alimento desde 70 -100 días pos eclosión se disminuyó significativamente el nivel de estradiol-17β en el plasma y se incrementó el nivel de 11-ketotestosterona	Ruksana <i>et al.</i> 2010

Continuación...

<i>Oreochromis mossambicus</i>	Letrozol	5-6 días pos eclosión letrozol en dosis de 100, 200 mg kg <sup>-1</sup> y combinaciones de letrozol 50 mg kg <sup>-1</sup> y 17a - MT 25 mg kg <sup>-1</sup> ; letrozol 100 mg kg <sup>-1</sup> y 17 a- MT 25 mg kg <sup>-1</sup>	Letrozol 200 mg kg <sup>-1</sup> y letrozol 100 mg kg <sup>-1</sup> y 17 a-MT 25 mg kg <sup>-1</sup> produjo el 100 % de individuos machos.	Das <i>et al.</i> 2011
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	Letrozol	10 días pos eclosión 20, 50, y 100 mg kg <sup>-1</sup> alimento	75.5%, 83.3%, y 75.0% de machos respectivamente	Chen <i>et al.</i> 2015

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio húmedo de Acuicultura del Dpto. de Acuicultura e Industrias Pesqueras de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina, también se utilizó tanques e instalaciones del Centro de Investigación Piscícola.

#### **3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

Esta investigación fue parte del Proyecto Especial N° 398-2012: “Nuevas alternativas de producción de alevines machos de tilapia (*Oreochromis niloticus*): tratamientos no hormonales y uso de tecnología de bioflocs” que fue financiado por del Concejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC).

La investigación fue diseñada para ser ejecutada en dos fases:

##### **Primera Fase: Evaluación del efecto de diferentes dosis de letrozol en la inversión sexual**

Esta fase tuvo una duración de 120 días, considerando 30 días de administración de los diferentes niveles de letrozol y 90 días post tratamiento para el crecimiento y desarrollo de los peces con la finalidad de facilitar la evaluación del sexo. Consistió en la evaluación del crecimiento, supervivencia e inversión sexual con diferentes dosis del inhibidor de aromatasa letrozol, bajo condiciones experimentales que se recomiendan para la inversión sexual mediante la hormona 17 alfa metil testosterona.



## **Segunda Fase: Evaluación de la masculinización con diferentes periodos de tratamiento**

La segunda fase con una duración de 111 días, 21 días de tratamiento con letrozol y 90 días post tratamiento para el crecimiento y desarrollo de gónadas con fines de evaluación del sexo. Durante este segundo experimento se evaluó la masculinización de los peces que recibieron alimento con letrozol en una dosis de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> durante dos y tres semanas, en condiciones experimentales similares a las realizadas en la primera fase.

### **3.3 ANIMALES EXPERIMENTALES**

Se seleccionaron seis hembras y tres machos de tilapia gris *Oreochromis niloticus* del Centro de Investigación Piscícola y fueron mantenidos en un tanque de concreto de 1,5 m por 3 m para su reproducción, recibieron alimento balanceado comercial con 40 por ciento de proteína a una tasa de alimentación del 3 por ciento de la biomasa diariamente. La temperatura fue mantenida en 26 °C, y la calidad del agua fue controlada mediante el recambio diario del 10 por ciento del volumen. Se observó diariamente hasta el desove, fecundación e incubación con la finalidad de extraer los huevos o larvas de la boca de las hembras.

Luego de aproximadamente 20 días se extrajeron larvas de la boca de las hembras y fueron trasladadas a tinas de plástico hasta que completen la reabsorción del saco vitelino, siendo mantenidas con aireación constante y temperatura de 28 °C. Después de cuatro días se seleccionaron 1950 peces (4-5 días pos eclosión) con una longitud total promedio de 9,2 mm y peso promedio de 0,0075 g los que fueron utilizados en la primera fase del trabajo de investigación.

Este procedimiento fue realizado por segunda vez para obtener los peces de la segunda fase seleccionándose 780 peces (5-6 días pos eclosión) con una longitud total de 9,9 mm y un peso promedio de 0,0127 g.

### 3.4 DIETAS EXPERIMENTALES

En los experimentos de la primera y segunda fase se utilizó un alimento comercial de inicio para tilapias marca Aquatech con 45 por ciento de proteína y un tamaño de grano de 1,5 mm. El alimento fue molido y tamizado para obtener un tamaño de partícula de 500  $\mu$ m. Asimismo se utilizó alcohol medicinal al 96 por ciento como disolvente del letrozol y de la hormona 17 MT. Con estos insumos se prepararon 5 dietas experimentales para la primera fase de la siguiente manera:

- Alimento con tres concentraciones de letrozol, 50, 100 y 200 mg.kg<sup>-1</sup> alimento. Se disolvió el letrozol (nombre comercial FEMARA) en alcohol con cada una de las concentraciones elegidas, en un recipiente con 200 g de alimento pulverizado se adicionó 100 ml (proporción 2:1) de la solución alcohol–letrozol mezclándose homogéneamente, para asegurar que todo el alimento quede impregnado del inhibidor.
- Alimento con una concentración de 60 mg de 17 MT por Kg de alimento (control positivo), se disolvió la hormona en 100 ml de alcohol, este fue adicionado a 200 g de alimento pulverizado y fue mezclado de forma similar a las preparaciones anteriores.
- Alimento sólo con alcohol (control negativo), adicionando y mezclando 100 ml de alcohol a 200 g de alimento.

La mezcla de cada una de las dietas fue realizada manualmente utilizando guantes de goma y mascarillas tapa boca. Posteriormente éstas fueron extendidas en una capa fina para la evaporación del alcohol durante 24 horas bajo sombra y en un lugar ventilado.

Luego de ese tiempo los alimentos completamente secos fueron almacenados en recipientes opacos debidamente etiquetados en refrigeración hasta su uso.

El alimento usado en la segunda fase experimental fue preparado de la forma anteriormente explicada considerando como único tratamiento la dosis de 50 mg.kg<sup>-1</sup> de alimento.

### **3.5 UNIDADES EXPERIMENTALES**

Se emplearon 15 acuarios de 60 litros de volumen (tres tratamientos, un control positivo y un control negativo con tres repeticiones cada uno) los cuales fueron lavados y desinfectados con una solución de ácido clorhídrico al 10 por ciento, enjuagados profusamente, y se acondicionaron con 40 litros de agua de pozo a 28 °C, mediante calefactores con termostato. La aireación fue administrada mediante un sistema de conducción de aire por tuberías desde un *blower* de 1/3 HP (marca Sweetwater), con manguerillas de aireación, válvulas reguladoras y piedras difusoras para cada acuario. Se cubrieron tres lados de los acuarios con plástico negro para uniformizar la incidencia de la luz y evitar el estrés en los peces.

En el experimento de la segunda fase se utilizaron seis acuarios acondicionados mediante el mismo procedimiento que en la fase anterior, tres de ellos se destinaron para el tratamiento de alimentación durante dos semanas con la dosis de letrozol 50 mg.Kg<sup>-1</sup> y los otros tres para el tratamiento durante tres semanas con la misma dosis.

### **3.6 CONTROL DE PARÁMETROS AMBIENTALES**

La calidad del agua fue mantenida mediante recambios diarios del 10 hasta el 50 por ciento del volumen total de los acuarios, incrementándose el recambio conforme se incrementaba la biomasa en el tiempo, este procedimiento fue el mismo en ambas fases de experimentación. Diariamente antes del recambio se retiraron mediante un sifón las heces y restos de alimento del fondo de los acuarios, interrumpiendo la aireación durante esta limpieza. Adicionalmente los días de control biométrico, cada semana, los acuarios eran limpiados en su totalidad con una renovación completa del agua. El agua utilizada en los recambios fue mantenida siempre a la misma temperatura experimental para evitar cambios bruscos de temperatura.

El oxígeno disuelto, la temperatura fueron medidos diariamente durante la mañana (8:00 horas) y la tarde (15:00 horas) con un medidor de oxígeno con sensor de temperatura marca YSI modelo 550 y el pH solo en las tardes con un medidor portátil marca OAKTON modelo pHTestr 20.

### **3.7 ETAPA EXPERIMENTAL**

#### **3.7.1 PRIMERA FASE**

Se sembraron 130 peces por acuario equivalente a una densidad de 3000 peces.m<sup>-3</sup>, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en cada acuario por tratamiento. Durante 30 días fueron alimentados según las tablas descritas para el protocolo de masculinización mediante la hormona 17 MT (Popma y Green 1990). Durante la primera semana se suministró el alimento a una tasa del 20 por ciento de la biomasa al día, distribuido en cuatro raciones diarias, se observó el consumo total del alimento con la finalidad de corregir la cantidad de alimento entregado, semanalmente la tasa fue reajustada considerando el incremento de la biomasa (g) y la mortalidad en cada unidad experimental. Se procedió de la misma forma con los tratamientos, controles y repeticiones durante todo el experimento.

Los controles biométricos de peso y longitud se hicieron en los días 8, 16, 24, 32 pesando la biomasa de cada acuario por tratamiento, utilizando y una balanza analítica (0,0001 g de precisión) marca DENVER, la longitud total fue medida a un 10 por ciento de los peces de cada unidad experimental con una regla graduada en milímetros.

#### **a. Evaluación del crecimiento y sobrevivencia**

Las mediciones de longitud y peso en cada uno de los controles biométricos por tratamientos y controles fueron registrados para hallar los valores promedios de crecimiento e incremento de la longitud y el peso. El conteo total de los peces al final de la etapa experimental permitió calcular la supervivencia.

#### **Crecimiento:**

Longitud total individual promedio (mm) =  $\Sigma$  long. individual de muestra de peces / número de muestra

Peso individual promedio (g) = Biomasa de cada acuario / número de peces por acuario

Incremento Longitud total promedio (mm) = Lf-Li

Incremento Peso promedio (g) = Pf-Pi

Dónde:

Li es la longitud total individual promedio al inicio del experimento

Lf es la longitud total individual promedio al final del experimento

Pi es el peso individual promedio al inicio del experimento

Pf es el peso individual promedio al final del experimento

**Sobrevivencia**  $S (\%) = N_f/N_i \times 100$

Dónde:

$N_f$  es el número de peces al final del experimento

$N_i$  es el número de peces al inicio del experimento

#### **b. Evaluación del porcentaje de machos**

Luego de finalizado el experimento, una muestra de los peces por cada tratamiento y repetición permanecieron en los mismos acuarios y fueron alimentados con la dieta comercial de 45 por ciento de proteína y con un diámetro de partícula de 1 mm, durante 90 días, durante este periodo se varió la tasa de alimentación desde el 10 por ciento hasta el 5 por ciento, se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura y calidad de agua para permitir su crecimiento y el desarrollo gonadal con la finalidad de realizar la evaluación del sexo cuando los peces sean de mayor tamaño.

Luego de este periodo los peces fueron sacrificados haciendo un corte en la zona dorsal posterior a la cabeza y mediante disección se extrajeron las vísceras de la cavidad celómica dejando sólo las gónadas ubicadas sobre la parte ventral de la vejiga gaseosa (zona dorsal de la cavidad celómica), Anexo 1.

Antes de extraer las gónadas de la cavidad celómica se adicionó 5 gotas de formalina (10%) y luego de 2–3 minutos fueron extraídas separando una de las gónadas sobre una lámina portaobjeto y la segunda en un vial de plástico, adecuadamente rotulado, conteniendo formol diluido al 10 por ciento para la preparación del material histológico.

La evaluación de las gónadas se realizó mediante: (1) La técnica de observación al microscopio de una de ellas en fresco y coloreada con aceto-carmín recomendada por Wassermann y Bertolla (2002); Guerrero y Shelton (1974) y (2) Evaluación histológica para lo cual la otra gónada fue fijada en formol al 10 por ciento, Anexos 2 y 3.

La primera gónada en fresco fue coloreada con dos gotas de aceto carmín, luego fue cubierta con una laminilla presionando ligeramente antes de ser observada al microscopio (NIKON Eclipse E200) para la identificación del sexo, se utilizaron los objetivos de 10X, 40X y 100X (Ver Anexo 2).

La segunda gónada de cada uno de los peces analizados; luego de ser fijada fue entregada al laboratorio de ictiopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la preparación de los cortes histológicos según método estándar con tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) (Anexo 2) y posteriormente identificada y registrada mediante el microscopio y una cámara digital (NIKON Coolpix P310) adaptada al sistema.

### **3.7.2 SEGUNDA FASE**

Para el experimento de la segunda fase se tomó en cuenta los resultados de masculinización en la primera fase experimental y se seleccionó la dosis de letrozol de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  por su eficiencia en la obtención de individuos machos con la mínima dosis de las evaluadas.

Se sembraron 130 peces en cada unidad experimental, bajo las mismas condiciones descritas en la fase 1, se distribuyeron aleatoriamente para evaluar la obtención de peces machos luego de la alimentación en dos periodos de tiempo, dos semanas y tres semanas.

Durante este experimento los peces fueron alimentados siguiendo las mismas tasas de alimentación, al inicio 20 por ciento y 4 raciones diarias la cuales fueron ajustadas luego de los controles biométricos semanales realizados sólo al 10 por ciento de los peces por acuario. El menor número de peces evaluados en los controles fue para disminuir la mortalidad observada durante la primera fase.

La alimentación con el inhibidor fue suspendida en tres acuarios al finalizar la segunda semana y al finalizar la tercera semana en los tres restantes, luego los peces continuaron

en los mismos acuarios recibiendo alimento comercial, hasta completar los 30 días, una muestra de peces de cada acuario fue separada para continuar alimentándolos durante 60 días hasta alcanzar el tamaño para la evaluación del sexo y la determinación de la masculinización con el método descrito anteriormente.

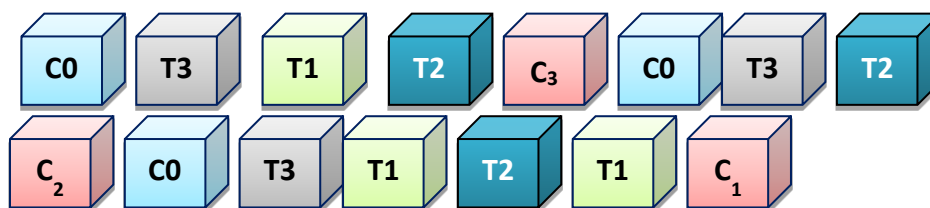
### **3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **3.8.1 PRIMERA FASE**

El diseño experimental aplicado fue un Diseño completamente al azar (DCA) con 3 tratamientos, un control positivo y un control negativo y 3 repeticiones de cada uno, como se describe a continuación:

- Control positivo (C): Peces alimentados con un alimento comercial y la hormona 17 alfa metil testosterona. Con un concentración de  $60 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento
- Control negativo (C0): Peces alimentados con un alimento comercial
- T1 : Peces alimentados con un alimento comercial y letrozol a una concentración de  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento
- T2 : Peces alimentados con un alimento comercial y letrozol a una concentración de  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento de alimento
- T3 : Peces alimentados con un alimento comercial y letrozol a una concentración de  $200 \text{ mg. Kg}^{-1}$  de alimento

La Figura 5 representa la asignación aleatoria a las unidades experimentales de los tratamientos, controles y repeticiones.

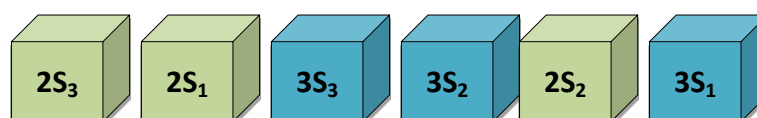


**Figura 5: Disposición de los tratamientos, controles y repeticiones durante la primera fase para la evaluación de dosis de letrozol en la masculinización de alevinos de tilapia gris.**

### 3.8.2 SEGUNDA FASE

El Diseño experimental aplicado fue un DCA con 2 tratamientos y 3 repeticiones (Figura 6)

- 2S: Peces alimentados con letrozol en la dieta a una concentración de 50 mg. Kg<sup>-1</sup> de alimento durante dos semanas
- 3S: Peces alimentados con letrozol en la dieta a una concentración de 50 mg.. Kg<sup>-1</sup> de alimento durante tres semanas



**Figura 6: Disposición de los tratamientos y repeticiones durante la segunda fase para la evaluación del tiempo de tratamiento con letrozol.**

### 3.9 PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DATOS

Las diferencias en los valores promedio de incremento en peso y longitud entre tratamientos durante la primera fase fueron evaluados mediante un ANVA de una sola vía y una comparación de Tuckey, la sobrevivencia mediante una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.



La eficiencia de masculinización entre tratamientos y controles para los resultados de la primera y segunda fase fue realizada mediante comparación de proporciones macho:hembra con un nivel de significancia de 0,05 (Anexos 4 y 5).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 EVALUACIÓN DE LAS DOSIS DE LETROZOL

#### 4.1.1 PARÁMETROS AMBIENTALES

La temperatura, el oxígeno disuelto y el pH promedios del agua de los acuarios por tratamientos y controles durante el periodo experimental son presentados en la Tabla 2.

**Tabla 2: Valores promedio por tratamientos y controles de la temperatura, el oxígeno disuelto (mañana y tarde) y el pH (tarde) durante la fase experimental**

Parámetros	Tratamientos				
	C	C0	T1	T2	T3
Temperatura mañana (°C)	28,16	28,03	28,04	28,09	28,05
DS	1,15	0,84	0,89	0,83	1,12
Temperatura tarde (°C)	28,28	28,1	28,22	28,21	28,22
DS	0,99	0,78	0,89	0,83	0,96
Oxígeno mañana (mg.L <sup>-1</sup> )	7,10	7,07	7,06	7,09	7,11
DS	0,29	0,26	0,22	0,25	0,26
Oxígeno tarde (mg.L <sup>-1</sup> )	6,99	6,95	6,97	6,98	7,05
DS	0,34	0,31	0,26	0,29	0,24
pH	7,95	7,93	7,95	7,95	7,97
DS	0,16	0,10	0,10	0,10	0,08

DS: desviación estándar

#### a. Temperatura

Se observa que los valores promedio de la temperatura durante las mañanas (cerca de 28°C) fueron similares a los valores en las tardes (28,2°C) en los tratamientos y

controles con desviaciones típicas entre 1,15 y 0,78. La Tabla 3 representa la variación promedio semanal de la temperatura, pudiéndose apreciar que en la primera semana la temperatura promedio fue ligeramente menor en casi todas las unidades experimentales y se estabilizó después en la tercera y cuarta semana alrededor de los 28,5°C. Esta variación inicial de temperatura fue similar entre los tratamientos corrigiéndose al calibrar los termostatos de los calefactores de cada acuario, obteniéndose así una temperatura más constante. Drummont *et al.* (2009), al evaluar el efecto de la temperatura en la etapa de inversión sexual de alevinos de tilapia *O. niloticus*, encontraron que ésta no es afectada en un rango entre los 26 y 32°C, sin embargo el crecimiento y la supervivencia fueron mejores con temperaturas entre 28,5 y 30°C.

Phelps (2006) menciona que la temperatura óptima para el mantenimiento de los alevinos de tilapia durante el periodo de inversión sexual está entre los 26 y 28°C y que con temperaturas menores a 24°C los peces reducen significativamente el crecimiento y algunos no completan la diferenciación gonadal durante el tratamiento, en el caso opuesto los valores de temperatura mayores a 34°C pueden alterar la proporción de sexos en algunas progenies de tilapia incrementándose el número de machos respecto al de las hembras (Baroiller *et al.* 2009) pero con bajas tasas de supervivencia. La temperatura establecida y controlada en esta investigación se mantuvo dentro de los rangos considerados óptimos para el tratamiento hormonal de los peces en todos los tratamientos y controles, no existiendo evidencia de haber sido una variable que pudiese haber afectado el proceso de inversión sexual.

**Tabla 3: Temperatura promedio semanal (°C) por tratamientos (mañana y tarde)**

Temperatura de la mañana				
Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
C0	26,9 ± 0,43	28,6 ± 1,06	28,3 ± 0,27	28,2 ± 0,20
C	26,9 ± 0,41	29,1 ± 1,60	28,3 ± 0,56	28,2 ± 0,27
T1	27,0 ± 0,45	28,5 ± 1,25	28,3 ± 0,27	28,3 ± 0,22
T2	26,9 ± 0,42	28,6 ± 0,95	28,4 ± 0,28	28,4 ± 0,21
T3	27,0 ± 0,41	28,6 ± 1,68	28,2 ± 0,79	28,3 ± 0,27
Temperatura de la tarde				
C0	27,2 ± 0,47	28,5 ± 0,72	28,1 ± 0,45	28,3 ± 0,56
C	28,5 ± 0,50	29,1 ± 1,17	28,2 ± 0,79	28,3 ± 0,48
T1	27,3 ± 0,49	28,6 ± 0,85	28,2 ± 0,76	28,4 ± 0,45
T2	27,2 ± 0,48	28,5 ± 0,63	28,2 ± 0,82	28,5 ± 0,43
T3	27,3 ± 0,49	28,8 ± 1,24	28,1 ± 0,84	28,5 ± 0,42

**b. Oxígeno disuelto**

Es un parámetro ambiental que puede afectar el proceso de inversión sexual por estar directamente relacionado al consumo del alimento, la supervivencia y el crecimiento de los peces, los valores de la Tabla 2 muestran que la concentración promedio durante las mañanas y las tardes estuvo cercana a 7.0 mg.L<sup>-1</sup> notándose una leve disminución en la tarde en todos los acuarios; se registró un valor máximo y mínimo de 7,89 y 6,02 mg.L<sup>-1</sup> durante un día en los controles C0 y C respectivamente.

La variación promedio semanal es presentada en la Tabla 4, en la cual se aprecia que durante la primera semana el oxígeno disuelto tuvo una concentración de 7,3 mg.L<sup>-1</sup> en casi todos los tratamientos a diferencia de las siguientes semanas donde los valores fueron cercanos a 7 mg.L<sup>-1</sup>. Esta relativa diferencia estuvo relacionada a la variación de temperatura que se dio en las unidades experimentales, por lo cual podemos asegurar que el oxígeno fluctuó principalmente debido a la temperatura del agua, asimismo no se observó una disminución con el incremento de la biomasa desde la

primera semana hasta el final del experimento, confirmando que el sistema de aireación y el manejo del sistema (recambios de agua) permitieron mantener su concentración con muy poca variación en los acuarios.

Respecto al nivel de oxígeno para la inversión del sexo en tilapias, Phelps (2006) recomienda concentraciones mayores a  $4 \text{ mg.L}^{-1}$  para no afectar el consumo de alimento con la hormona, así como también para evitar el estrés de los peces y la susceptibilidad a enfermarse. Los valores de oxígeno en el agua se mantuvieron por encima de  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  por tal razón se considera que no hubo un efecto negativo en el consumo del alimento o bienestar de los peces

**Tabla 4: Concentración de Oxígeno Disuelto promedio semanal ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) por tratamientos (mañana y tarde)**

Oxígeno disuelto de la mañana				
Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
C0	7,31	6,96	7,00	7,00
C	7,32	6,94	7,07	7,06
T1	7,28	6,95	7,04	6,99
T2	7,36	7,06	6,99	6,96
T3	7,34	6,98	7,03	7,07
Oxígeno disuelto de la tarde				
C0	7,31	6,90	6,91	6,77
C	7,34	6,89	6,97	6,84
T1	7,27	6,91	7,02	6,75
T2	7,34	7,02	6,96	6,71
T3	7,32	6,99	6,98	6,95

### c. pH

El pH del agua medido en las tardes se mantuvo con valores promedio alrededor de 7,95 con desviaciones típicas de 0,08 a 0,16 en los tratamientos y controles (Tabla 2). Se observó un valor máximo y mínimo de 8,16 y 7,62 durante un día en una de las repeticiones del control C y del tratamiento T1. La variación desde la primera semana hasta a la cuarta fue similar en todos los acuarios con un valor promedio inicial de 8

hasta valores de 7,8 (Tabla 5). El pH en los acuarios disminuyó ligeramente conforme se incrementó la biomasa desde el inicio al final del experimento, probablemente relacionado al incremento del dióxido de carbono disuelto por la respiración de los peces; sin embargo se mantuvo dentro del rango recomendado para el cultivo y la producción de tilapias entre 6 y 8,5 (Kubitza 2009). El manejo y la alcalinidad del agua contribuyeron a la estabilidad de este parámetro. No se ha demostrado el efecto del pH del agua en la determinación del sexo en *O. niloticus* como si ha sido observado en otros cíclidos como el *Apistogramma* sp. cuya proporción de sexos en ambientes con pH de 4,5 presenta un sesgo para individuos machos y a pH de 6,5 para las hembras (Romer y Benzenhers 1999).

**Tabla 5: Variación del pH promedio semanal en los tratamientos y controles**

Tratamiento	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
C0	8,04	7,89	7,94	7,88
C	8,11	7,89	7,95	7,89
T1	8,04	7,92	8,00	7,88
T2	8,07	7,94	7,97	7,88
T3	8,06	7,92	7,98	7,96

Estos resultados muestran que las condiciones ambientales durante la fase experimental fueron mantenidas dentro los rangos recomendados para el crecimiento, supervivencia y masculinización de alevinos de *O. niloticus*.

#### **4.1.2 CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS**

Los resultados obtenidos en el crecimiento y la supervivencia durante el experimento de evaluación de las tres dosis de letrozol para la masculinización de alevinos de tilapia son presentados en la Tabla 6, en ella se muestran los valores promedio de peso en gramos, longitud en milímetros y supervivencia en porcentaje, alcanzados por los peces luego de 30 días de experimentación con concentraciones de letrozol por kilogramo de alimento de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> (T1), 100 mg.Kg<sup>-1</sup> (T2) y 200 mg. Kg<sup>-1</sup> (T3) así

como también por el grupo control negativo (C0) y el grupo de peces que recibió 17 alfa metil testosterona en una dosis de 60 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento llamado control positivo (C). También se presentan el incremento en peso y longitud promedios por tratamiento.

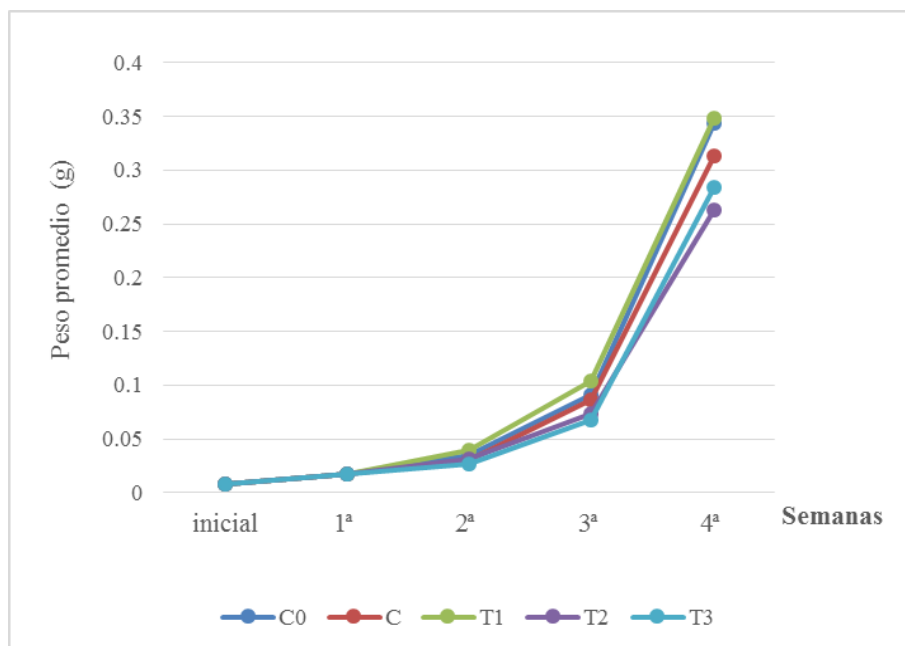
Los incrementos en longitud y en peso no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (T1, T2 y T3) ni con los controles positivo y negativo (C y C0). Sin embargo los peces del C y T1 presentaron longitudes promedio similares (27,7 mm) y ligeramente mayores a la de los peces del C0, T2 y T3 (27, 26 y 26,3 mm). Los pesos promedio al final del experimento fueron 0,348; 0,344; 0,313; 0,263 y 0,284 g en el T1, C0, C, T2 y T3 respectivamente.

**Tabla 6: Crecimiento y supervivencia promedio de tilapia nilótica (*O. niloticus*) en la evaluación de dosis de letrozol**

Parámetros	Tratamientos				
	C0	C	T1	T2	T3
Supervivencia (%)*	57 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	62 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>
Longitud inicial prom. (mm)	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2
Peso inicial prom. (g)	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075
Longitud final prom.(mm)	27	27,7	27,7	26,0	26,3
Peso final prom. (g)	0,344	0,313	0,348	0,263	0,284
Incremento long prom. (mm)*	17,8 <sup>b</sup>	18,5 <sup>b</sup>	18,5 <sup>b</sup>	16,8 <sup>b</sup>	17,1 <sup>b</sup>
Incremento peso prom. (g)*	0,336 <sup>c</sup>	0,306 <sup>c</sup>	0,341 <sup>c</sup>	0,255 <sup>c</sup>	0,277 <sup>c</sup>

\*nivel de significancia del 5 por ciento.

Los peso promedios obtenidos de los controles biométricos de los alevinos de *O. niloticus* sometidos a diferentes dosis y tratamiento son representados en la Figura 7.

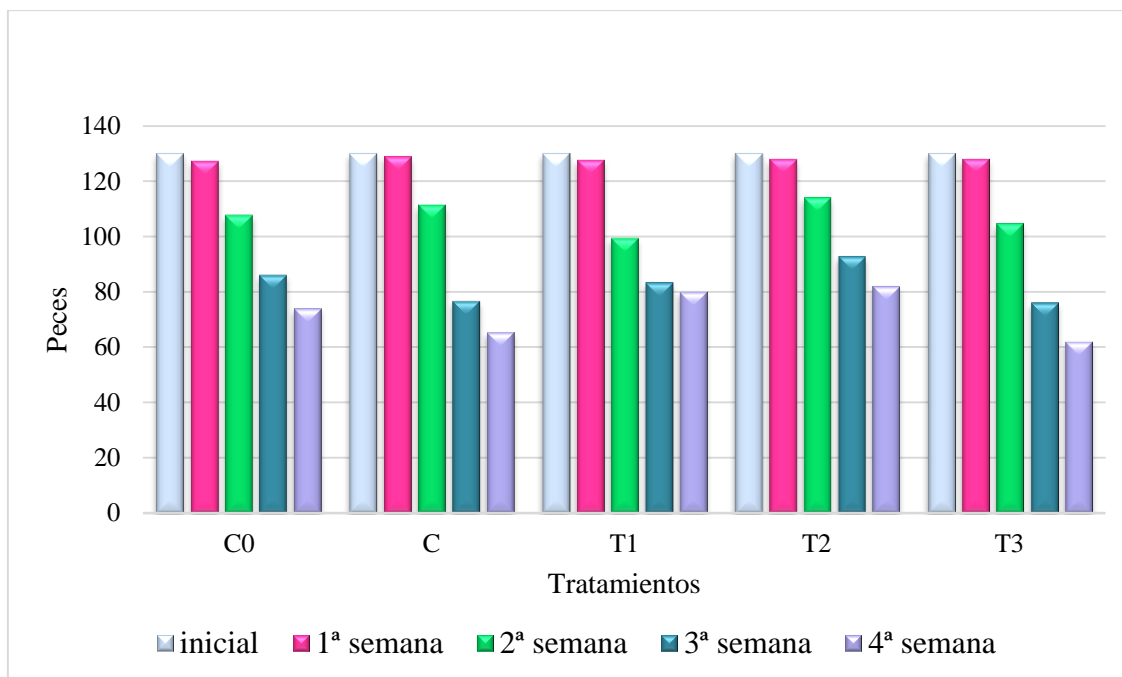


**Figura 7: Curva de peso promedio semanal de alevinos de tilapia (*O. niloticus*) sometidos a diferentes dosis de letrozol y controles positivo y negativo**

El crecimiento observado bajo las condiciones de temperatura, densidad y tasa de alimentación al ser comparados con otros estudios de condiciones similares está dentro del rango reportado por diversos autores durante la etapa de inversión sexual de *O. niloticus* (Popma y Green, 1990; Neumann, 2009; Drummond *et al.* 2009). Los resultados del crecimiento entre tratamientos y controles muestran que no hubo un efecto del uso del letrozol en el crecimiento en peso y longitud durante la etapa de inversión sexual.

La supervivencia promedio obtenida al final del experimento fue de  $57 \pm 7,6$ ;  $50 \pm 13,9$ ;  $62 \pm 6,8$ ;  $63 \pm 8,3$  y  $48 \pm 11,6$  por ciento en C0, C, T1, T2 y T3 respectivamente, se observó la menor supervivencia de 48 en T3 y la mayor de 63 por ciento en T2, se observó que en todos los tratamientos las repeticiones presentaron de forma similar un acuario con una mayor supervivencia, una intermedia y otra baja, indicando un comportamiento similar independiente de los tratamientos, otro aspecto importante de mencionar es que la mayor mortalidad en las unidades experimentales se observó a partir de la segunda semana y tercera semana siendo baja en la primera y última semana (Figura 8).





**Figura 8: Variación del número de peces debido a la mortalidad por tratamientos y controles durante el periodo experimental (n inicial =130).**

La evaluación estadística demostró que no hubo diferencias significativas en la supervivencia promedio entre tratamientos con dosis de letrozol de 50, 100 y 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento así como con el tratamiento con 17 MT (60 mg.Kg<sup>-1</sup>) y el control negativo, Popma y Green (1990) indican que la supervivencia esperada después del tratamiento hormonal está dentro del rango de 70 a 90 por ciento en estanques de tierra como sistemas de producción, los valores obtenidos en este estudio son más bajos, sin embargo considerando lo mencionado por Phelps y Popma (2000), quienes indican que la mortalidad se incrementa cuando la inversión sexual es realizada en tanques interiores a diferencia que cuando son tanques exteriores, puede explicar los resultados. Asimismo hay que considerar que la mortalidad en el presente trabajo pudo estar más relacionada con el manejo de los peces en todos los acuarios durante las biometrías, Popma y Green (1990) mencionan que los alevinos antes del tratamiento hormonal son muy pequeños y delicados para contarlos y pesarlos.

El control del crecimiento y el ajuste de la ración fueron realizados semanalmente, por lo cual fue necesario pesar y medir a los peces para asegurar la administración de las diferentes dosis de letrozol entregadas en el alimento durante la etapa experimental. Esto fue corregido en la segunda fase del trabajo disminuyéndose la manipulación con

mejores resultados en supervivencia. Otro factor relacionado a la mortalidad en la segunda y tercera semana puede explicarse por el comportamiento de territorialidad de la tilapia que establece jerarquías con individuos dominantes que compiten con ventaja por el alimento impidiendo la alimentación de los peces subordinados los que son más vulnerables al canibalismo o muerte por inanición (Cruz y Mair 1994). En nuestro experimento fue notable el comportamiento territorial de los peces, notándose el incremento de la heterogeneidad en las dos últimas semanas pudiéndose distinguir peces clasificados en grandes (mayores a tres cm de longitud total), medianos (entre dos y tres cm) y pequeños (menores a dos cm).

#### 4.1.3 EVALUACIÓN DE LA INVERSIÓN SEXUAL CON DIFERENTES DOSIS DE LETROZOL

Los resultados de la inversión sexual de los peces sometidos a las tres dosis de letrozol figuran en la tabla 7, los porcentajes de peces machos obtenidos fueron de  $90 \pm 11,3$ ;  $100 \pm 0,0$ ;  $93 \pm 11,5$  en dosis de letrozol de  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (T1),  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  y  $200 \text{ mg.Kg}^{-1}$  respectivamente y de  $66 \pm 8,9$  por ciento para el tratamiento control (C) con una dosis de  $17 \text{ MT } 60 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento y  $45 \pm 5,0$  por ciento en el control negativo (C0). También se observan las proporciones de machos, hembras e individuos intersexo para todos los tratamientos y controles. La presencia de individuos intersexo sólo fue observada en los tratamientos con  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  alimento (T1) y  $200 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento (T3) de letrozol y con MT (C) a dosis de  $60 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento.

**Tabla 7: Resultados de la obtención de hembras, machos e intersexo con los diferentes tratamientos**

Tratamiento mg.Kg <sup>-1</sup> de alimento	n° peces	N° machos	N° hembras	N° intersexo	% machos	% hembras	% intersexo
T1 (Lt. 50)	33	30	1	2	90 <sup>a</sup>	3	7
T2 (Lt.100)	32	32	0	0	100 <sup>a</sup>	0	0
T3 (Lt.200)	24	23	0	1	93 <sup>a</sup>	0	7
C0	36	16	20	0	45 <sup>b</sup>	55	0
C ( MT 60)	28	19	9	0	66 <sup>c</sup>	29	5

Nivel de significancia 0.05

Lt. :letrozol, MT :17 alfa metiltestosterona

Los tratamientos con letrozol presentaron diferencias significativas al compararlos con los controles, el porcentaje de individuos machos fue mayor en los tres tratamientos siendo más efectivos bajo las condiciones del experimento que el tratamiento control con MT, los niveles de letrozol entre el rango de 50 a 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento permitieron la masculinización de alevinos de tilapia mayor al 90 por ciento.

Trabajos realizados con otros inhibidores de aromatasa como el fadrozole utilizando dosis mayores a 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento reportan resultados de masculinización mayores al 96 por ciento para la misma especie, (Kwon *et al.* 2000). Afonso *et al.* (2001) ensayando concentraciones de fadrozole de 75 a 100 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento reportaron una masculinización del 100 por ciento en alevinos de *O. niloticus*.

Das *et al.* (2012) reportan valores de 97 y 100 por ciento al aplicar letrozol a los alevinos de tilapia mosambica (*O. mossambicus*) con niveles entre 100 y 200 mg.Kg<sup>-1</sup> y con dosis combinadas de letrozol y MT respectivamente de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> + 25 mg.Kg<sup>-1</sup> y 100mg.Kg<sup>-1</sup> + 25 mg.Kg<sup>-1</sup>, los resultados fueron de 92,3 y 100 por ciento correspondientemente.

Betancur *et al.* (2014) al evaluar dosis de exemestano y letrozol, dos inhibidores de aromatasa de tercera generación de tipo I y II, para la masculinización de alevinos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*), obtuvieron individuos machos con un 92,6 por ciento en 100 mg.kg<sup>-1</sup> de letrozol y menores al 80 por ciento con dosis de 25 mg. Kg.<sup>-1</sup> de letrozol .

En el presente trabajo al analizar los resultados de masculinización obtenidos con letrozol en dosis de 50, 100 y 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento administrado durante 30 días y comparando con los resultados de los trabajos mencionados empleando el letrozol y otros inhibidores de aromatasa, se observó que la eficiencia de la masculinización del letrozol vía oral es dependiente y se incrementa con las dosis administradas, valores mayores de 90 por ciento de peces machos a partir de concentraciones de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento han sido obtenidos. Este efecto en función de la dosis también fue logrado con el fadrozole durante la masculinización de alevinos de *O. niloticus* reportado por Kwon *et al.* (2000) quienes evaluaron tratamientos con niveles entre 40 a 500 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento, encontrando que las dosis a partir de 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento

permitieron la masculinización de más del 90 por ciento de los peces. Los mismos autores al analizar la variabilidad de los resultados mencionaron que el fadrozole produjo el 100 por ciento de machos en 2 repeticiones de 3 con dosis de 400 mg.Kg<sup>-1</sup> y en 3 repeticiones de 5 con dosis de 500 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento.

La variabilidad de la masculinización observada en el presente estudio con las tres dosis de letrozol considerando tres repeticiones para cada dosis fue como sigue: 100 por ciento de individuos machos con dosis de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> en 1 repetición de 3, en las 3 repeticiones con dosis de 100 mg.Kg<sup>-1</sup> y en 2 repeticiones de 3 con dosis de 200 mg.Kg<sup>-1</sup>, al comparar con los resultados de Kwon *et al.* es notable la mayor potencia del letrozol respecto al fadrozole, el cual requiere dosis mayores para obtener un mayor número de peces machos. Este inhibidor es mencionado como el inhibidor de aromatasas de tercera generación más potente (Bhatnagar 2007).

Al comparar la eficiencia de las tres dosis de letrozol evaluadas en esta investigación, no se encontraron diferencias estadísticas entre los resultados de 50, 100 y 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento, a pesar de haber obtenido un menor número promedio de peces machos (90 por ciento) con la dosis de 50 mg.Kg<sup>-1</sup>, ésta fue elegida para continuar con la segunda fase experimental cuya finalidad fue la evaluación del tiempo de tratamiento en la masculinización.

Se decidió continuar el experimento con la menor dosis de letrozol considerando el porcentaje de individuos machos obtenidos más el porcentaje de individuos intersexo (7 por ciento) debido a que estos últimos, por sus características histológicas (escasos oocitos presentes en el tejido testicular) son considerados individuos con una baja capacidad reproductiva como los describen Popma y Green (1990), otro aspecto que se tuvo en cuenta para elegir la dosis más baja fue el económico, a menor dosis el costo del tratamiento disminuirá. Adicionalmente se tuvo en cuenta el efecto observado, con las dosis más elevadas, en la formación de las gónadas (ausencia de una de ellas) que se explicará posteriormente.

Respecto a los resultados con la hormona 17 MT, el control positivo en este experimento, el porcentaje promedio de peces machos (66 por ciento) diferente significativamente a los valores de las tres dosis de letrozol evaluadas, los diferentes

protocolos para el uso de esta hormona en la masculinización reportan eficiencias mayores al 90 por ciento (Phelps y Popma 2000). La menor eficiencia promedio alcanzada en este experimento puede ser explicada principalmente por la variación del tamaño de los peces que fue observada (coeficiente de variación de la longitud total de los peces 26%), a pesar de que teóricamente se ajustó la tasa de alimentación semanalmente para que la cantidad del alimento sea la requerida para el crecimiento y la masculinización de toda la población, la presencia de peces dominantes impidieron un consumo individual homogéneo del alimento, por lo que las dosis efectivas de hormona que recibieron los peces denominados subordinados fue menor, la presencia de hembras (29 por ciento) e individuos con gónadas intersexo (5 por ciento) puede ser explicado por el menor consumo del alimento con hormona.

El crecimiento heterogéneo en peces territoriales como *O. niloticus* es explicado por Azaza *et al.* 2013, cuando evaluaron el efecto de la densidad sobre el crecimiento, la homogeneidad del tamaño y la variación del consumo de alimento en cultivos de *O. niloticus*, en dicho trabajo los autores encontraron una variación en el consumo de alimento entre los peces dominantes en comparación con los subordinados, los primeros por tener una mayor capacidad de consumir más alimento con un consecuente crecimiento más rápido, un mayor tamaño y dominio que los peces subordinados los cuales experimentaron estrés, disminución del apetito, mayores costos metabólicos debido a la menor oportunidad de alimentarse.

Otro aspecto importante que puede haber influenciado en el bajo porcentaje de machos obtenidos con MT es la cantidad de alimento administrado, ya que se consideró una tasa de alimentación inicial del 20 por ciento que varió gradualmente hasta el 15 por ciento de la biomasa por día en la última semana de investigación, al realizar posteriormente otros experimentos de inversión sexual, se consiguieron mejores resultados de masculinización (90 por ciento) eligiendo una mayor tasa, 30 por ciento de la biomasa por día y bajo condiciones similares de temperatura, densidad de peces e insumos utilizados (Ramírez 2015). Se reportan resultados de tratamientos con 17 MT con valores mayores al 90 por ciento de peces machos de *O. niloticus*, aplicando dosis entre 40 - 60 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento y tasas de alimentación entre 15 a 20 por ciento de la biomasa por día distribuidos en 4 raciones diarias (Phelps y Popma, 2000),

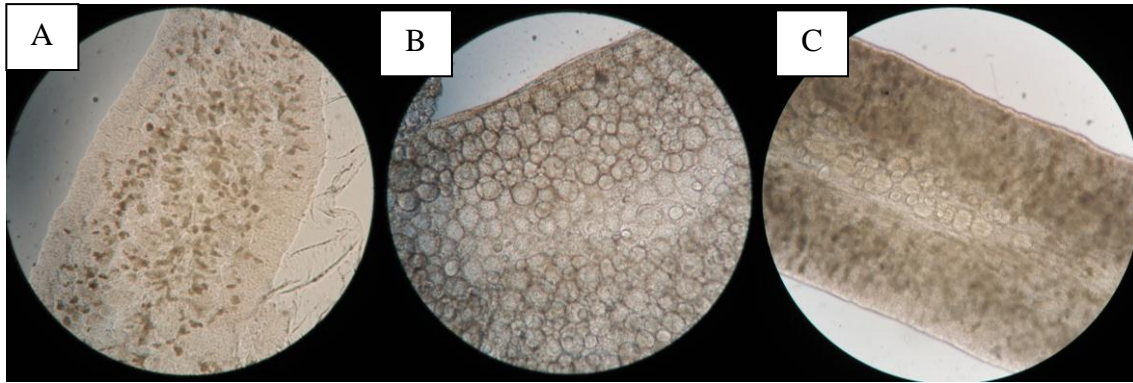
sin embargo no se reporta si se presentó crecimiento heterogéneo entre los peces tratados.

Los resultados del control negativo fueron diferentes significativamente al porcentaje obtenido con los peces del control positivo (17 MT) y con las tres dosis de letrozol, estos valores se encuentran dentro de lo esperado al tener una proporción similar entre individuos machos y hembras (55 y 45 por ciento) o una proporción cercana a 1:1 como se menciona en la teoría de proporción de sexos.

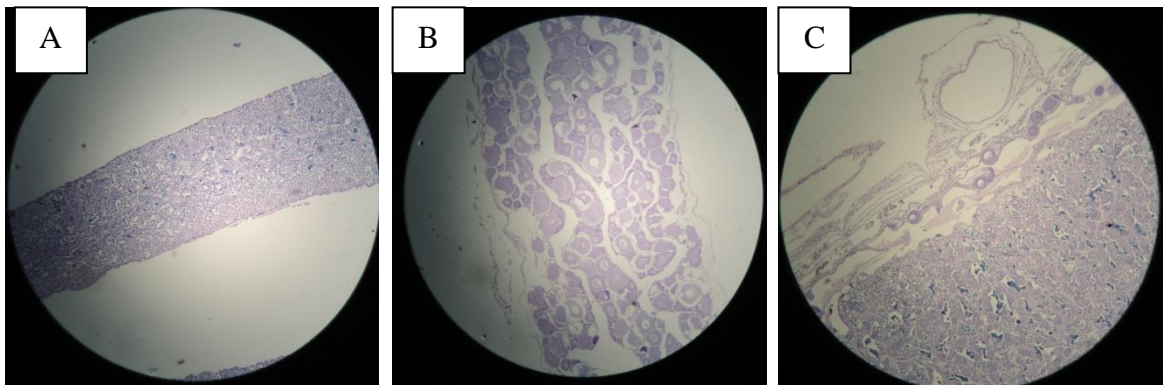
#### **4.1.4 DESCRIPCIÓN DE GÓNADAS CON DIFERENTES DOSIS DE LETROZOL**

Las gónadas de los peces fueron evaluadas para la identificación del sexo después de 90 días del tratamiento con letrozol y MT, la evaluación mediante el método en fresco con tinción de aceto carmín y mediante la preparación de cortes histológicos fueron eficientes para identificar claramente individuos machos, hembras e intersexo, como se ilustra en la Figuras 9 y 10.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wassermann y Bertolla (2002) quienes validaron el método de aceto carmín propuesto por Guerrero y Shelton (1974) para la identificación del sexo mediante la observación de gónadas frescas analizadas con un microscopio óptico. El sexo identificado mediante la observación de las muestras frescas fue confirmado por los resultados de las muestras histológicas, se pudieron apreciar en el caso de gónadas de machos lóbulos testiculares con diferentes grados de desarrollo (Figuras 9A y 10A), en el caso de gónadas de las hembras se visualizaron oocitos (Figuras 9B y 10B) y en gónadas intersexo fue notable la presencia de oocitos distribuidas entre el tejido testicular (Figuras 9C y 10C).



**Figura 9: Observación microscópica en fresco de las gónadas de tilapia de individuos (A) machos, (B) hembras, (C) intersexo, 100X.**



**Figura 10: Observación microscópica de muestras histológicas de las gónadas de tilapia de individuos (A) machos, (B) hembras, (C) intersexo, 100X.**

#### **a. Gónadas masculinas**

Del análisis histológico de las muestras de gónadas masculinas de peces sometidos a los tratamientos y controles se pudo observar predominantemente peces en estadio 2 o en desarrollo, de acuerdo a las clases o estadios sugeridos y adaptados por diversos autores (Núñez y Duponchelle 2009; Brown-Peterson *et al.* 2011 y Kosai *et al.* 2011). Las gónadas en estadio 2 están caracterizadas por poseer numerosos cistos bien organizados con diferentes estadios espermatogénicos que van desde espermatogonias hasta espermátides, como se muestra en la Figura 11.

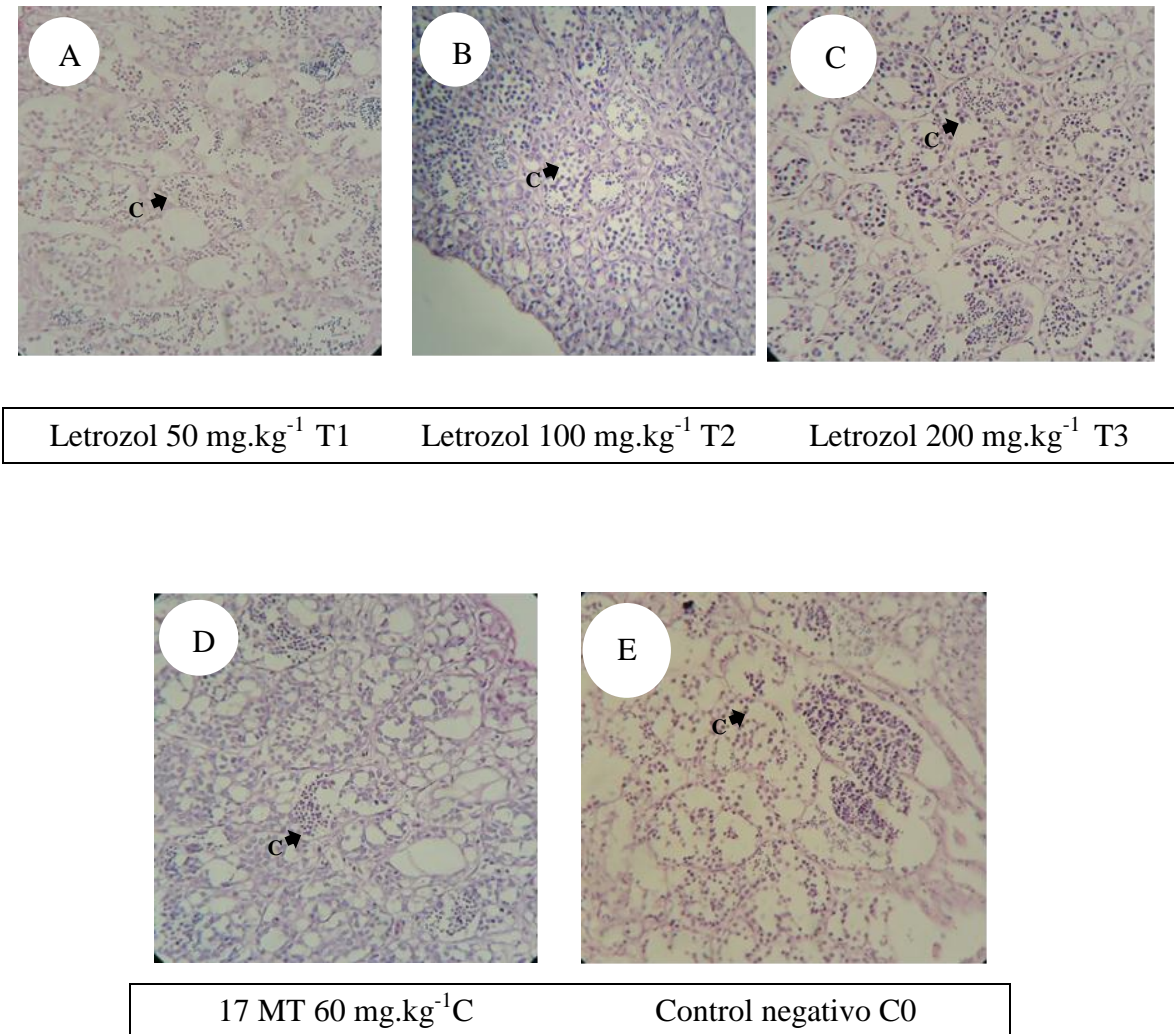
Dentro de cada tratamiento, por ejemplo en T2 y T3, los peces presentaron diferentes estados de maduración pudiéndose identificar peces del estadio 1 al 3. Las gónadas en estadio 1 son inmaduras y se reconocen por la ausencia de la actividad espermatogénica en el tejido intersticial y la presencia de espermátocitos primarios (figuras 12A y 13A) y el estadio 3 con una espermatogénesis intermedia y presencia de espermátocitos, espermátides y espermatozoos en proporciones similares (figuras 12C y 13C). No se puede relacionar estas diferencias con algún efecto de los tratamientos, ya que no fue evaluado el número de peces de cada estadio, la presencia de algunos peces en un estado más avanzado de madurez gonadal puede estar relacionada al crecimiento heterogéneo de los peces, ya que los peces de mayor tamaño por dominancia del grupo pueden presentar un estadio más avanzado. Se conoce la influencia de las gónadas en el crecimiento de los peces teleósteos como es el caso de las tilapias del género *Oreochromis* (Bhatta *et al.* 2012).

Se encontraron individuos machos con una sola gónada en los tratamientos con letrozol, con la dosis de 100 mg.Kg<sup>-1</sup>, (un pez de 35 ejemplares evaluados) y con la dosis de 200 mg.Kg<sup>-1</sup> (dos peces machos de 24 analizados). Un menor número de peces con presencia de las dos gónadas luego de ser sometidos al tratamiento con citrato de tamoxifeno, un compuesto anti estrógeno (dosis de 75 y 100 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento), fue reportado por Zanoni (2011) durante el proceso de inversión sexual de tilapia del Nilo (*O. niloticus*), el autor encontró hembras con una sola gónada, explicando este hecho a la acción del tamoxifeno de interrumpir la síntesis, el transporte y metabolismo de las hormonas, pudiendo ocasionar cambios en la organización y funciones en el órgano diana.

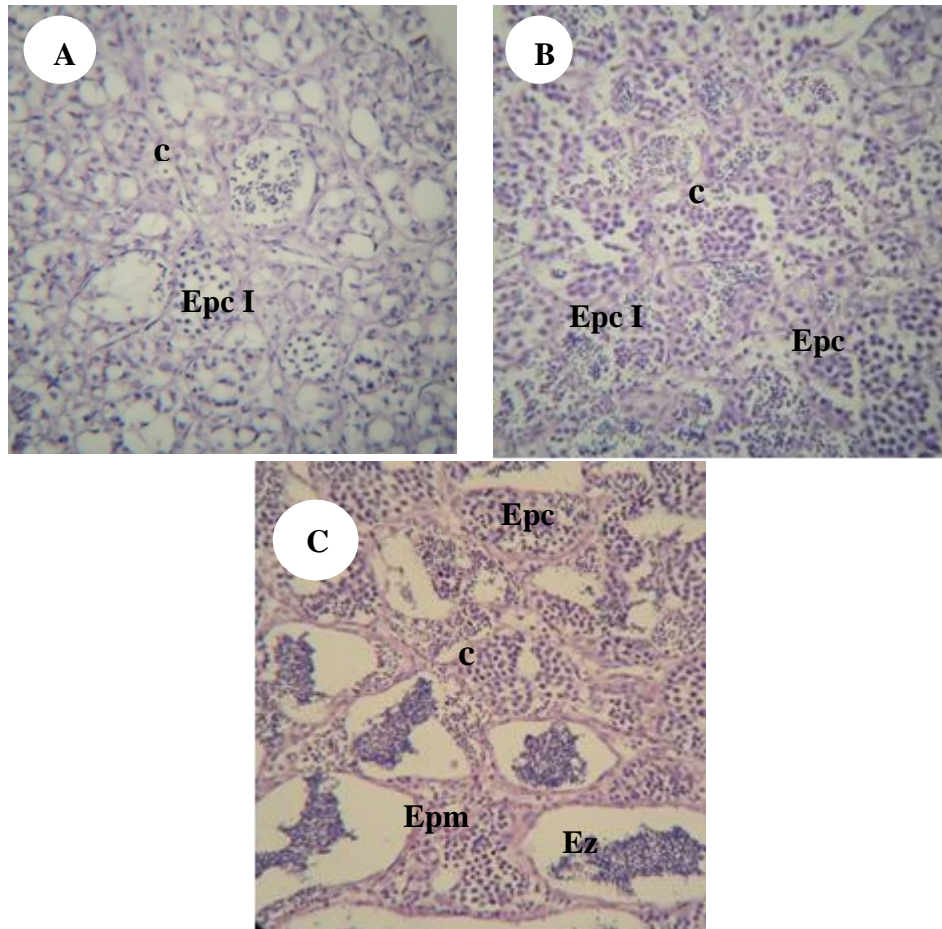
En el caso del letrozol, su acción es reversible, es decir actúa mientras está presente en el sistema, inicialmente en el cerebro como primer lugar de aromatización y en las gónadas, limitando la síntesis del 17 β estradiol (E2) hormona necesaria para la diferenciación de los ovarios desde los primeros días del proceso. En esta investigación se observó la ausencia de una gónada en peces machos a diferencia del trabajo con el tamoxifeno. Se analizó mediante la observación histológica de este único testículo y se evidenció la presencia de estructuras completas como en los peces con gónadas pares. Algunos autores encontraron que el daño gonadal estuvo



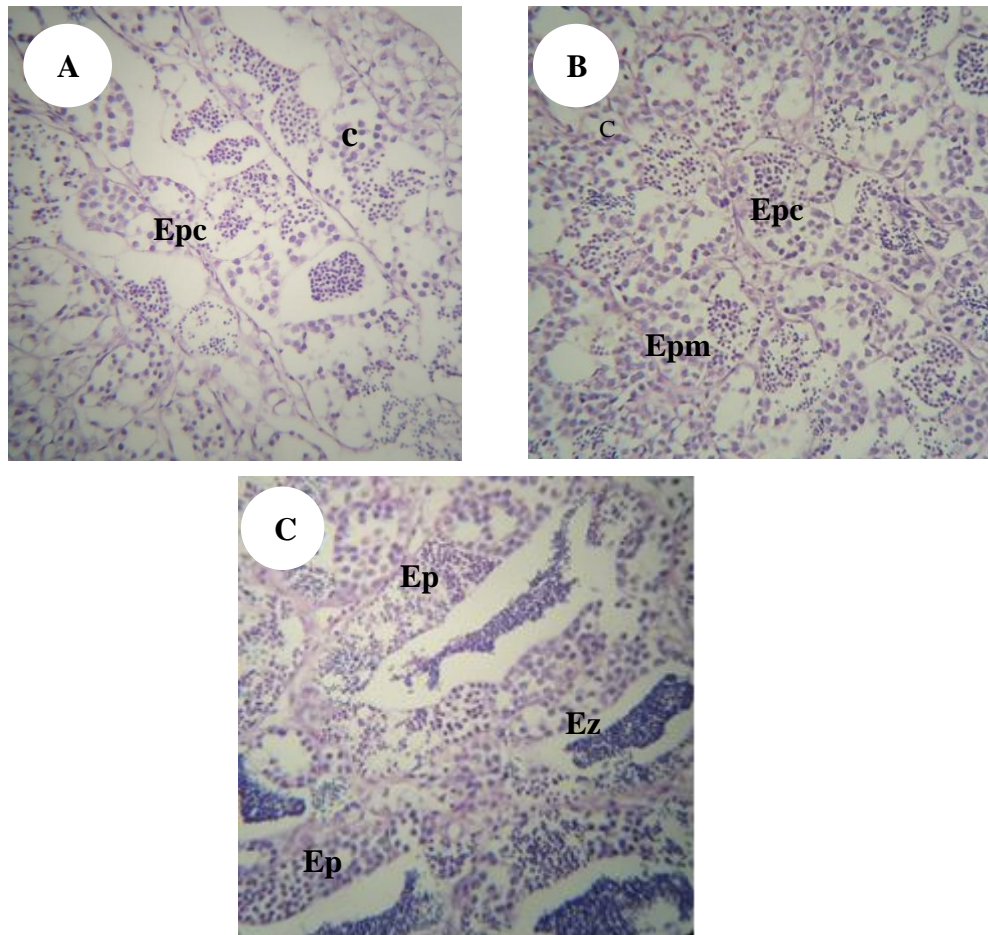
relacionado al exceso de estrógenos y andrógenos en ensayos con especies de tilapia resultando peces estériles (Kats *et al.*; Okoko mencionados por Phelps 2006), en nuestro estudio la presencia de un solo testículo podría estar relacionada al nivel de andrógenos en los peces que recibieron dosis altas de los inhibidores de aromatasas durante la diferenciación gonadal, factor que no fue medido, sin embargo se requiere de estudios más profundos para esclarecer los mecanismos de acción del letrozol en relación a esta anomalía.



**Figura 11: Cortes histológicos de gónadas masculinas de peces que recibieron dosis de letrozol (A,B,C), 17 alfa metiltestosterona (D) y ningún masculinizante (E) en el alimento durante 30 días. Cistos (c) 400X.**



**Figura 12:** Cortes histológicos de gónadas masculinas con diferentes estadios de desarrollo de los peces sometidos a dosis de letrozol de  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de alimento durante 30 días. A) estadio 1, B) estadio 2, C) estadio 3. Cisto (c), espermatocito primario (Epc I), espermatocito (Epc), espermatíde (Epm), espermatozoide (EZ), 400X.

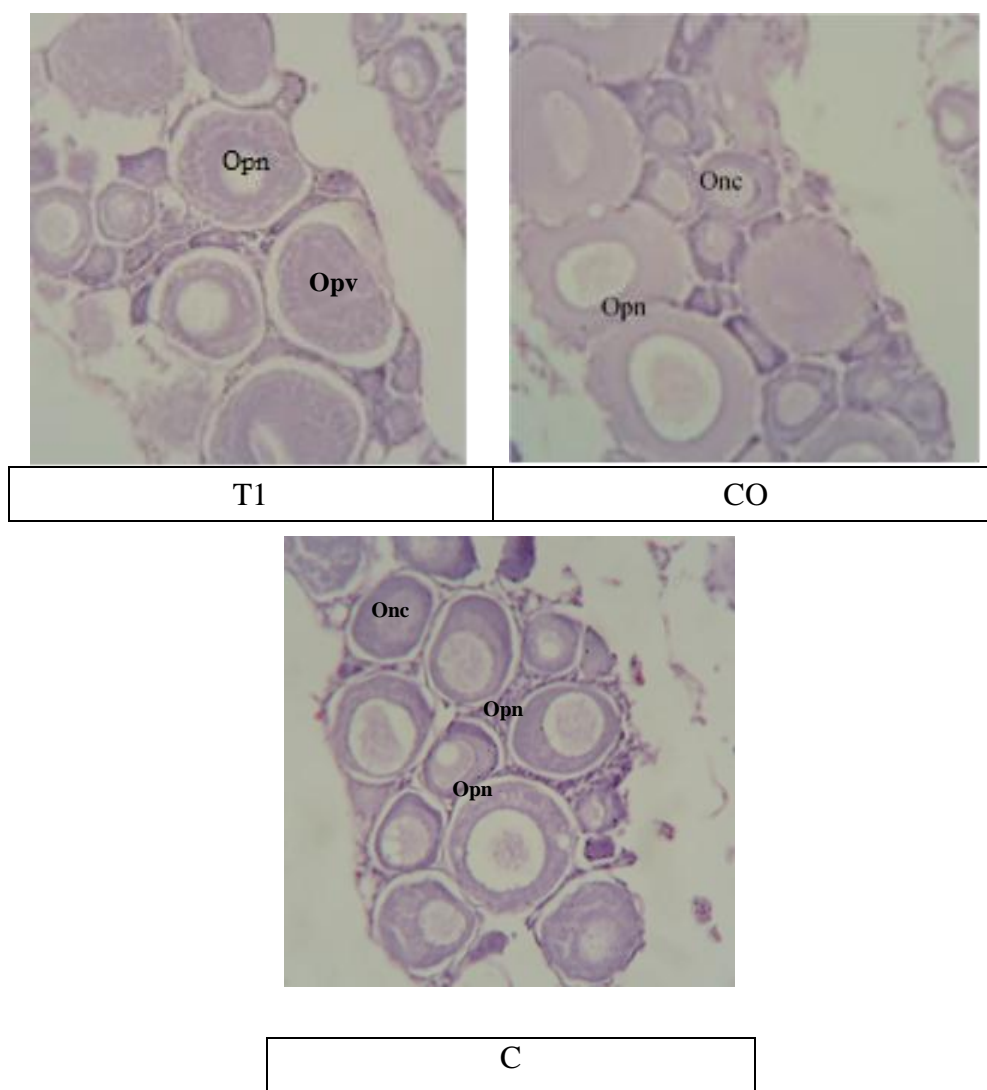


**Figura 13:** Cortes histológicos de gónadas masculinas con diferentes estadios de desarrollo de peces sometidos a dosis de letrozol de 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento durante 30 días. A) estadio 1, B) estadio 2, C) estadio 3. Cisto (c), espermatocito primario (Epc I), espermatocito (Epc), espermatíde (Epm), espermatozoide (Ez), 400X.

#### **b. Gónadas femeninas**

Respecto a la observación de gónadas femeninas halladas en peces que recibieron dosis de letrozol de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> (Figura 14), el análisis histológico muestra una conformación similar a las gónadas de las hembras del control negativo (C0) y del control (C) peces que recibieron 60 mg de 17 MT por Kg de alimento.

Las gónadas femeninas de los peces con los tratamientos mencionados presentaron las estructuras típicas de los ovarios de peces como: la túnica albugínea, las lamelas ováricas con oocitos en diferentes fases de desarrollo, los oocitos en etapa nucleocromatínica, etapa perinuclear y se observaron pocos oocitos pre vitelogénicos. Las pocas hembras (3 por ciento) encontradas luego del tratamiento para masculinización con dosis de letrozol de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento no presentaron gónadas con oocitos maduros tres meses después del tratamiento.



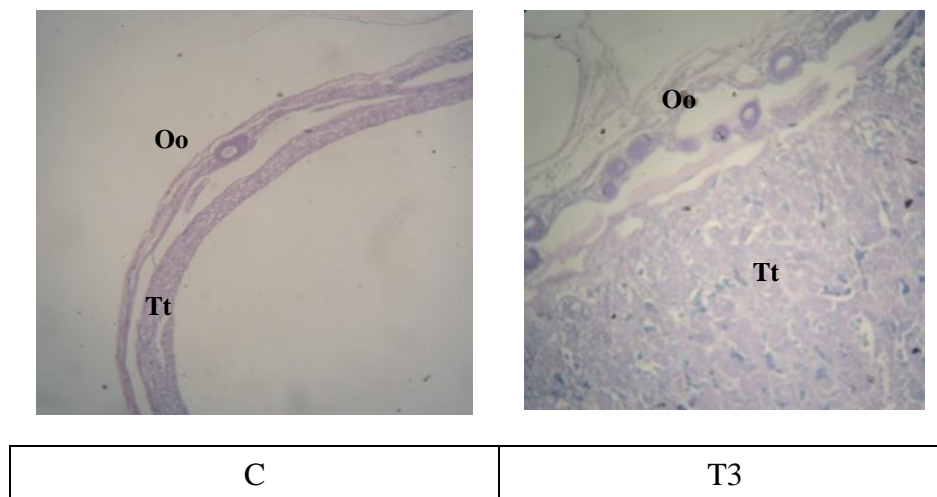
**Figura 14: Cortes histológicos de gónadas femeninas de peces que recibieron dosis de letrozol de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento (T1), 17 alfa metiltestosterona 60 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento (C) y sólo alcohol en el alimento (C0) durante 30 días. Oocitos en etapa nucleocromatínica (Onc), Oocitos etapa perinuclear (Opn), Oocitos pre vitelogénicos o etapa alveolo cortical (Opv), 400X.**

### **c. Gónadas intersexo**

En la evaluación de los ejemplares para la identificación del sexo se encontraron peces intersexo en los tratamientos T1, T3, y C (figura 15) cuyas gónadas presentaron oocitos en el tejido testicular y fueron visibles en las muestras en fresco y en las histológicas.

Phelps (2006) menciona que los peces intersexo, debido al tratamiento con hormonas, contienen una variedad de combinaciones de tejido testicular y ovárico diferentes en términos del porcentaje de un tipo de tejido dentro de la gónada y de su localización; también indica que la viabilidad reproductiva de estos peces es difícil de evaluar.

Popma y Green (1990) reportaron que dosis sub óptimas durante el tratamiento hormonal dan lugar a individuos intersexos, en el presente estudio se encontraron en un porcentaje de 5 a 7 por ciento y pudo ser a consecuencia de la dispersión de tamaños y territorialidad observada en todos los tratamientos. La no ocurrencia de peces con gónadas intersexo entre los tratados con dosis de letrozol de 100 mg.Kg-1 de alimento podría estar relacionada a las dosis altas más altas en el sistema permitiendo la masculinización de un alto porcentaje de individuos a pesar de la competencia por el alimento entre los peces. Las gónadas observadas presentaron diferentes grados de inclusión de tejido ovárico en los testículos, siendo muy reducido y principalmente ubicado en la zona anterior y media de las gónadas no observándose en la zona posterior o caudal.



**Figura 15:** Cortes histológicos de gónadas intersexo de peces del control 17 alfa metil testosterona 60 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento (C) y tratamiento con 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento (T3). Oocito (Oo), tejido testicular (Tt), 400X.

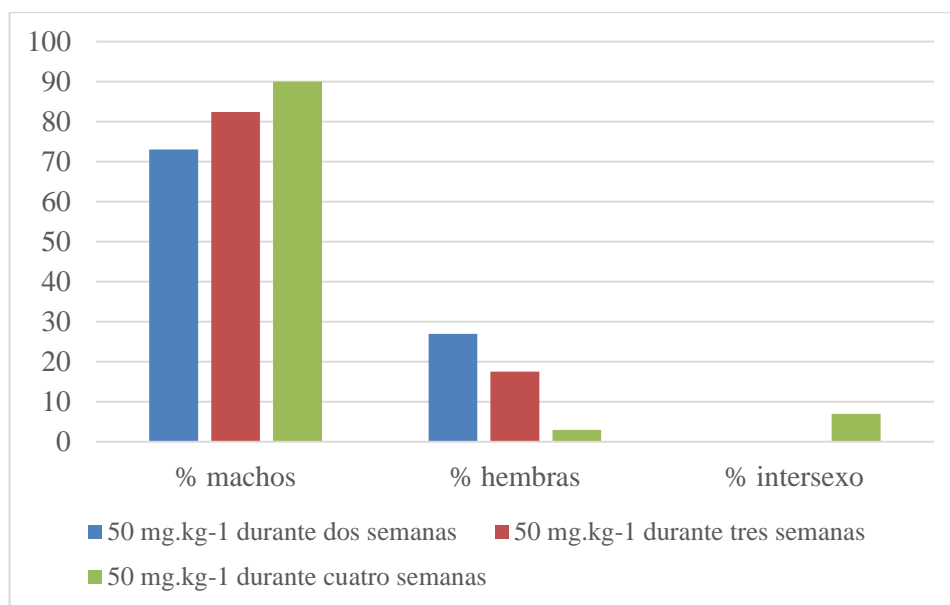
#### 4.2 EVALUACIÓN DE TIEMPOS DE APLICACION DEL TRATAMIENTO CON LETROZOL

Los resultados obtenidos en la inversión sexual aplicando diferentes tiempos de tratamiento con letrozol con dosis de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento son presentados en la Tabla 8, se puede apreciar que los porcentajes de masculinización fueron 73 y 82 por ciento en los tratamientos de dos y tres semanas respectivamente.

**Tabla 8:** Resultados de la evaluación del sexo de peces sometidos a tratamiento con 50 mg de letrozol por Kg de alimento durante dos y tres semanas

Tratamiento letrozol	N° peces	N° machos	N° hembras	% machos	% hembras
50 mg.kg <sup>-1</sup> durante dos semanas	115	84	31	73± 3,71	27
50 mg.kg <sup>-1</sup> durante tres semanas	114	94	20	82±10,58	18

Estos valores son menores a los obtenidos en la primera fase del estudio donde el 90 por ciento de los peces evaluados fueron machos después de un mes de tratamiento con la misma dosis (Figura 16).



**Figura 16: Peces machos, hembras e intersexo (%) obtenidos con la adición de letrozol en el alimento (50 mg.Kg<sup>-1</sup>) en diferentes tiempos de tratamiento.**

Afonso *et al.* (2001) obtuvieron resultados con un comportamiento similar al utilizar el fadrozole para la masculinización de *O. niloticus*, con dosis de 50, 75 y 100 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento, el porcentaje de individuos machos fue del 67, 76 y 90 por ciento respectivamente después de los 15 días de tratamiento y de 77, 100 y 100 por ciento a los 30 días de alimentación con esas mismas dosis. Al comparar estos resultados con los del presente trabajo se aprecia que con 50 mg de letrozol por Kg de alimento administrado durante 15 días de tratamiento el porcentaje de machos fue mayor al obtenido con la misma dosis de fadrozole (73 vs. 67 por ciento) así como también a los 30 días (90 vs. 77 por ciento), confirmándose la mayor potencialidad de inhibición del letrozol.

El incremento de peces machos en relación al tiempo de administración puede ser explicado debido al mecanismo de acción del letrozol, un inhibidor enzimático no esteroideo que se une reversiblemente al sitio activo de la enzima y actúa mientras la concentración del inhibidor sea suficiente para tener ocupado el sitio de unión enzimática. Cuando es utilizado en pacientes humanos se reporta que la vida media de eliminación es de 42 horas y su concentración estable puede ser alcanzada entre dos a seis semanas, lo que hace que su efecto sea dependiente de la concentración y del tiempo de administración (Bhatnagar 2007).

No se han encontrado reportes sobre el tiempo de vida media de eliminación en tilapias u otros peces pero si ha sido reportado su efecto en la disminución de la concentración del E2 y el incremento de andrógenos y progestágenos en el plasma de los salmones (Afonso et al. 2000) luego de ser aplicado. Posiblemente en este trabajo no se haya alcanzado hasta la tercera semana la concentración de equilibrio en todos los peces tratados con 50 mg de letrozol en el alimento considerando que la dosis en el alimento es entregado a todos los peces (hembras y machos genéticamente).

Al revisar el proceso de diferenciación sexual de *O. niloticus* los peces tienen gónadas indiferenciadas hasta aproximadamente antes de los 20 días después de la eclosión (Piferrer 2001; Kobayashi 2013), por lo cual si se debe someter a un tratamiento para la inversión del sexo, los peces deben ser alimentados antes de ese periodo para obtener los mejores resultados.

En el experimento los peces tenían una edad de 6 días después de la eclosión al iniciar el tratamiento; por lo tanto si se suministró sólo 15 días el alimento con 50 mg.K<sup>-1</sup> del inhibidor de aromatasa, estos peces aún se encontraban en proceso de diferenciación con 21 días después de la eclosión, presumiendo que la dosis aportada hasta ese momento no fue suficiente para lograr que todos los peces genéticamente hembras (55 por ciento de la población) se inviertan a machos.

Podemos confirmar por los resultados que durante las dos primeras semanas el tratamiento fue efectivo en masculinizar a casi la mitad de las hembras que recibieron letrozol en la dieta y que esta cantidad fue mayor en tres semanas de tratamiento, donde casi el 65 por ciento de las hembras fueron invertidas a machos, el tratamiento



continuo hasta los 30 días permitió un mayor porcentaje (90 por ciento) de peces machos con la dosis evaluada.

Dado el mecanismo de acción de este inhibidor en función a dosis y tiempo de aplicación y teniendo en cuenta que los procesos de meiosis ovárica culminan después de 30 días pos eclosión y que la plasticidad de las gónadas de *O. niloticus* para invertir su sexo puede extenderse hasta después de haber completado la diferenciación sexual tal como lo reportan Paul-Prasanth *et al.* (2013) y Sun *et al.* (2014), se puede sugerir que el tiempo de tratamiento con letrozol en dosis de 50 mg.K<sup>-1</sup> de alimento debería ser mayor a los 30 días para obtener más del 90 por ciento de individuos machos. Esta es una ventaja respecto al uso de la hormona 17 alfa metiltestosterona u otros andrógenos para la masculinización, debido a que cuando se usan dosis mayores a 60 mg.kg<sup>-1</sup> de alimento y por tiempos mayores a las 4 semanas ocurre la mal denominada “feminización paradójica” tal como lo reportan diversos autores (Piferrer 2001, Phelps y Okoko, 2010) y que aún no se ha determinado claramente que mecanismos anulan el efecto de dosis elevadas de andrógenos disminuyendo la proporción de machos obtenidos en el tratamiento.

Lo que podemos concluir de este ensayo es que el tiempo de aplicación del tratamiento con letrozol con 50 mg.Kg<sup>-1</sup> para obtener la mayor concentración de individuos machos es de 30 días, tiempos menores de tratamiento no serán adecuados para completar la masculinización del 90 por ciento de los peces tratados.

La masculinización de alevinos de tilapia *O. niloticus* mediante el uso del inhibidor de aromatasas letrozol fue efectiva con dosis desde 50 a 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento cuando fue administrado antes del inicio de la diferenciación sexual hasta treinta días de tratamiento a una tasa de alimentación inicial de 20 por ciento de la biomasa por día disminuyendo hasta el 15 por ciento de la biomasa en la última semana.

No se puede concluir que este producto puede ser un método alternativo al uso de andrógenos debido a que se requiere de estudios para definir tiempos y cantidades mínimas de efectividad paso previo a la estimación de costos del tratamiento debido a que actualmente es un producto de alto costo al ser usado preferentemente en el

tratamiento de cáncer de mama y otras patologías que requieren el control de la concentración de los estrógenos en el sistema.

Asimismo se requieren de estudios más profundos sobre los efectos colaterales o ambientales de su utilización en la producción de peces para acuicultura.

## V. CONCLUSIONES

1. Las dosis de letrozol de 50, 100, 200 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento fueron efectivas en la masculinización de alevinos de *O. niloticus* con más del 90 por ciento de individuos machos.
2. El tratamiento con el inhibidor de aromatasa letrozol para la masculinización tiene una acción dependiente de su concentración y tiempo de tratamiento.
3. El tiempo de tratamiento para la obtención del mayor porcentaje de machos con letrozol a una dosis de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento fue de 30 días.
4. El letrozol con la dosis de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento produjo una mayor masculinización que el tratamiento con 17 alfa metiltestosterona bajo las condiciones experimentales.
5. Las dosis de letrozol mayores a 100 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento pueden tener efectos en la formación de las gónadas.
6. Las dosis de letrozol de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de alimento no afectó el desarrollo gonadal pos tratamiento de los peces machos naturales e invertidos.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda evaluar el efecto del incremento del número de raciones por día para los tratamientos con letrozol, teniendo en cuenta su característica de acción, de inhibir la actividad de la aromatasa mientras este está presente.
- Se recomienda evaluar el uso del letrozol con dosis menores a  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  y periodos de tratamientos mayores a 30 días.
- Se recomienda evaluar la performance productiva de los peces masculinizados con letrozol en comparación con peces tratados con MT.
- Se recomienda evaluar la estabilidad de la inversión sexual de los peces tratados hasta periodos mayores de seis meses debido a la plasticidad de las gónadas de cambiar de sexo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Afonso,LOB; Iwama , GK, Smith, J; Donaldson, EM. 2000. Effects of the aromatase inhibitor Fadrozole on reproductive steroids and spermiation in male coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during sexual maturation. *Aquaculture* 188: 175–187.

Afonso, LOB; Wassermann, GJ; Terezinha de Oliveira, R. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Journal of Experimental Zoology* 290 (2): 177-181.

Baroiller, JF; Guiguen, Y; Fostier, A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55 (6-7): 910-931.

Baroiller, JF; Toguyeni, A. 2004. The Tilapiini Tribe: Environmental, and Social Aspects of Reproduction and Growth. *Fisheries and Aquaculture*, Safran, P. (Ed.) *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK.

Baroiller, JF; D'Cotta, H; Bezault, E; Wessels, S; Hoerstgen-Schwark, G. 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology* 153 (1): 30–38.

Bhatta, S; Iwai, T; Miura, C; Higuchi, M; Shimizu- Yamaguchi, S; Fukuda, H; Miura, T. 2012. Gonads directly regulate growth in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, July, 109 (28): 11408-11412.

- Beardmore, JA; Mair, GC; Lewis, RI. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197 (1): 283–301.
- Betancur, J; Ostos, H; Olivera, M. 2009. Administración oral de inhibidores de la aromatasa (aromP450) como método alternativo de reversión sexual en tilapia roja (*Oreochromis spp*). *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*; 22:3.
- Bhatnagar, AS. 2007 The discovery and mechanism of action of letrozole, *Breast Cancer Research and Treatment* 105(1): 7-17.
- Bombardelli, RA.; Hayashi, C; Meurer, F. 2004. Aplicacao de metodos diretos e indiretos para a producao de populacoes monossexuais na tilapicultura. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* 7 (1):57-68.
- Brown-Peterson, NJ; Wyanski, DM; Saborido-Rey, F; Macewicz, BJ; Lowerre-Barbieri SK. 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes, *Marine and Coastal Fisheries*, 3:1, 52-70.
- Chang, XT; Kobayashi, T; Kajiura, EH; Nakamura, M; Nagahama, Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *Journal of molecular endocrinology*, 18(1): 57-66.
- Chang, X; Kobayashi, T; Senthilkumaran, B; Kobayashi-Kajura, H; Sudhakumari, CC; Nagahama, Y. 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and comparative endocrinology*, 141(2): 101-115.
- Cnaani, A; Levavi-Sivan, B. 2009. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. *Sexual Development* 3:164-175.

- Das R.; Rather, MA; Basavaraja, N; Sharma, R; Udit UK.; 2012. Effect of Nonsteroidal Aromatase Inhibitor on Sex Reversal of *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 64(4):1-6.
- D'cotta, H; Fostier, A; Guiguen, Y; Govoroun, M; Baroiller, JF. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. Molecular Reproduction Development 59 (3): 265-276.
- Devlin, RH; Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences, Aquaculture. 208: 191-364.
- DIGEMID, 2011. Sistema Integrado, Registro de Productos Farmacéuticos. Dirección de Autorizaciones Sanitarias (En línea). Consultado en noviembre 2011. Disponible en <http://www.digemid.minsa.gob.pe/aplicaciones/Perudis/Index.asp>
- Fenske, M; Segner, H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology 67:105-126.
- Gao, ZX; Wang, HP; Wallat, G.; Yao, H; Rapp, D; O'Bryant, P; MacDonald, R; Wang, WM, 2010. Effects of a nonsteroidal aromatase inhibitor on gonadal differentiation of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. Aquaculture Research, 41: 1282-1289.
- Green, BW; Teichert-Coddington, DR. 2000. Human Food Safety and Environmental Assessment of the Use of 17 $\alpha$ -Methyltestosterone to Produce Male Tilapia in the United States. Journal of the World Aquaculture Society, 31: 337–357.
- Green, BW; Veverica, KL; Fitzpatrick, MS. 1997. Fry and fingerling production. Egna, HS; Boyd, CE (eds.) Dynamics of Pond Aquaculture, p 215-243 CRC Press, Boca Raton, FL, United States.
- Guerrero III R; Shelton, W. 1974. An Aceto-Carmine Squash Method for Sexing Juvenile Fishes. The Progressive Fish-Culturist 36 (1): 56.

- Guiguen, Y, Baroiller, JF, Ricordel, MJ; Iseki, K; McMeel, OM; Martin, SA; Fostier, A. 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction Development*. 54: 154-162.
- Hiott, AE; Phelps, RP. 1993. Effects of initial age and size on sex reversal of *Oreochromis niloticus* fry using methyltestosterone, *Aquaculture* 112(4):301-308.
- Hunter, GA; Donaldson, EM. 1983. 5 Hormonal Sex Control and its Application to Fish Culture. *Fish physiology*, 9: 223-303.
- Kobayashi, Y; Hiroguchi, R; Miura, S; Nakamura, M. 2010. Sex- and tissue-specific expression of P450 aromatase (*cyp19a1a*) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 155 (2): 237–244.
- Kobayashi, Y; Nagahama, Y; Nakamura, M. 2013. Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. *Sexual Development* 7: 115–125.
- Komatsu, J; Nakamura, S; Nakamura, M. 2006. Masculinization of female golden rabbitfish *Siganus guttatus* using an aromatase inhibitor treatment during sex differentiation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143: 402–409.
- Kwon, JY; Haghpanah, V; Kogson-Hurtado, LM; McAndrew, BJ; Penman, DJ. 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *Journal of Experimental Zoology*, 287 (1): 46-53.
- Kwon, JY; McAndrew, BJ; Penman, DJ. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction Development*, 59: 359- 370.



- Li, GL; Liu XC; Lin HR 2005. Aromatase inhibitor letrozole induces sex inversion in the protogynous red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Acta Physiologica Sinica* 57: 473–479.
- Macintosh D. 2010. Risks Associated with Using Methyl Testosterone in Tilapia Farming (En línea). Consultado abril 2016. Disponible en [http://media.sustainablefish.org/MT\\_WP.pdf](http://media.sustainablefish.org/MT_WP.pdf)
- Neumann, E; Ribeiro, TC; de Souza Braga, FM. 2009. Desempenho de três linhagens de tilápia submetidas ao tratamento com 17- $\alpha$  -metiltestosterona em condições ambientais não controladas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38 (6):973-979.
- Núñez J; Duponchelle F; 2009. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(1):167-80.
- Paul-Prasanth, B; Bhandari, RK; Kobayashi, T; Horiguchi, R; Kobayashi, Y; Nakamoto, M; Shibata, Y; Sakai, F; Nakamura, M; Nagahama, M. 2013. Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in terminally differentiated gonochorists. *Scientific Reports* 3: 2862.
- Penman, D; Piferrer F. 2008 Fish Gonadogenesis. Part 1: Genetic and Environmental Mechanisms of Sex Determination, *Reviews in Fisheries Science*, 16 (S1): 16-34.
- Phelps, RP; Popma, TJ. 2000. Sex reversal of tilapia. Costa-Pierce B.A.; Rakocy, J.E. (eds.) *Tilapia Aquaculture in the Americas* v. 2 p. 34–59. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Phelps, R. 2006. Hormone Manipulation of sex . Webster, CD; Lim, C (eds.). *Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition* Capítulo 6 p 236. CRC Press, New York, 704 p.

- Piferrer, F; Zanuy, S; Carrillo, M; Solar, II; Devlin, RH; Donaldson, EM. 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males *Journal of Experimental Zoology Part A* 270 (3): 255–262
- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
- Piferrer, F; Blázquez, M. 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish physiology and biochemistry* 31(2): 215-226.
- Piferrer, F; Blasquez, M; Navarro, L; Gonzales 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
- Popma, T; Green, B; 1990. Reversión sexual de tilapias en lagunas de tierra. International Center for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station Auburn University US. Research and Development Series N° 35. 30 p.
- PRODUCE 2010. Plan Nacional de Desarrollo Acuícola (En línea). Consultado en julio 2017. Disponible en <http://www2.produce.gob.pe/pesqueria/publicaciones/2010/enero/ds001-2010-produce.pdf>
- PRODUCE 2015 .Anuario estadístico pesquero y acuícola 2014 (En línea) Consultado agosto 2017. Disponible en <https://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2015.pdf>
- Ramírez, SY. 2015. Evaluación de la inversión sexual de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) bajo un sistema de bioflocs. Tesis Ing. Pesquero, Universidad Nacional Agraria la Molina , Lima- Perú. UNALM, 53 p.

- Ridha, M. 2011. Evaluation of monosex culture of GIFT and non-improved strains of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in recirculating tanks. International Aquatic Research 3: 189-195 (En línea) Consultado agosto 2016. Disponible en [www.intelaquares.com](http://www.intelaquares.com)
- Rougeot, C; Krim, A; Mandiki, SNM; Kestemont, P; Mélard, C. 2007. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, Theriogenology 67: 1046–1052.
- Ruksana, S; Pandit, N; Nakamura, M. 2010. Efficacy of exemestane a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 152 (1): 69-74.
- Smith I.E. 1999. Aromatase inhibitors: a dose-response effect? Endocrine-Related Cancer 6: 245-249.
- Steele, RE; Mellor, LB; Sawyer, WK; Wasvary, JM; Browne, LJ. 1987. In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective estrogen inhibition with the nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 16949A. Steroids, 50 (1):147-161.
- Sun, L N; Jiang, X L; Xie, QP; Yuan, J; Huang, BF, Tao, WJ; Wang, DS. 2014. Transdifferentiation of differentiated ovary into functional testis by long-term treatment of aromatase inhibitor in Nile tilapia. Endocrinology, 155(4), 1476-1488.
- Tanaka, M; Telecky, T M, Fukada, S; Adachi, S; Chen, S; Nagahama, Y. 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 b in the ovary. Journal of Molecular Endocrinology 8 (1):53-61.

- Toguyeni, A.; Fauconneau, B.; Fostier, A.; Abucay, J.; Mair, G.; Baroiller, J.F. 2002. Influence of sexual phenotype and genotype, and sex ratio on growth performances in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 207: 249–261.
- Uller, T; Helanterä, H. 2011. From the Origin of Sex-Determining Factors to the Evolution of Sex-Determining Systems. *The Quarterly Review of Biology* 86 (3): 163-180.
- Uno, T; Ishizuka, M; Itakura; T. 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34: 1–13
- Wassermann GJ; Bertolla LO. 2002. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *Ciência Rural, Santa Maria* 32(1): 133-139.
- Zanoni, MA. 2011. Avaliação do citrato de tamoxifeno e temperatura na inversão sexual da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Tese (doutorado em Zootecnia) Universidade Estadual de Maringá, Brasil 63 p.

## VIII. ANEXOS

**ANEXO 1: Método de para la identificación del sexo de peces juveniles con el tinte Aceto Carmín. Adaptado de Guerrero y Shelton, 1974; Wassermann y Bertolla 2002.**

Este método puede ser aplicado a ejemplares de peces juveniles o peces adultos cuando las gónadas estén inmaduras.

Puede ser aplicado a muestras en fresco, fijadas en formol o conservadas en alcohol.

### **Preparación del tinte:**

- Adicionar 0.5 g de carmín en polvo a 100 ml de ácido acético al 45 % en un recipiente resistente al calor y poner a ebullición durante 2 a 4 minutos.
- Dejar enfriar y filtrar la solución con un papel de filtro para eliminar partículas gruesas.
- Almacenar en un recipiente de vidrio oscuro y protegido de la luz.

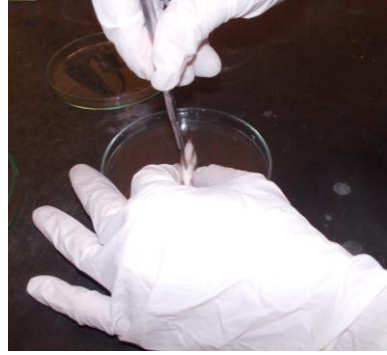
### **Identificación de tejido gonadal:**

- Sacrificar a los peces con tallas promedios de 3.5 cm, hacer un corte a nivel de cavidad celómica, retirar las vísceras (intestino, estomago, hígado etc.).
- Las gónadas inmaduras son difíciles de identificar, éstas se encuentran ubicadas en contacto con la región ventral de la vejiga gaseosa. Se observan como dos filamentos finos translúcidos en peces inmaduros.
- Adicionar 3 a 5 gotas de formol al 10% para fijar el tejido gonadal antes de extrae

- Esperar algunos minutos y luego con la ayuda de una pinza y tijera finas extraer una porción o todo el órgano haciendo corte en la zona caudal y distal.
- Colocar el órgano o porción de tejido sobre una lámina portaobjeto adicionar dos gotas del tinte aceto carmín y con la ayuda de una laminilla cubreobjetos realizar un ligero aplastamiento del tejido.
- Observar al microscopio con magnificaciones de 25 hasta 100 X.
- Identificar el sexo según las estructuras femeninas o masculinas de las gónadas.



SACRIFICIO DE PECES



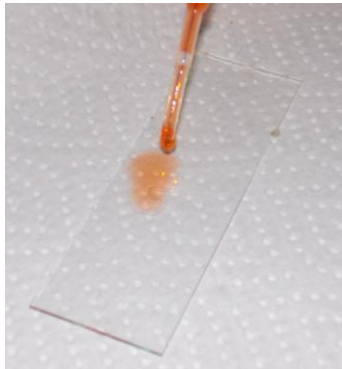
DISECCIÓN



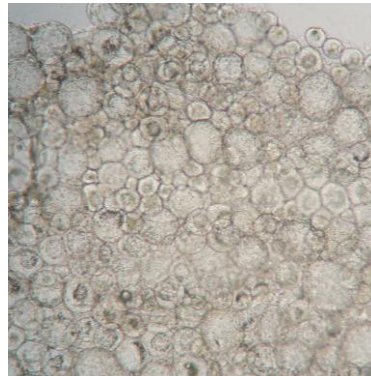
RETIRO DE LAS VISCERAS



GONADAS EN PORTAOBJETOS



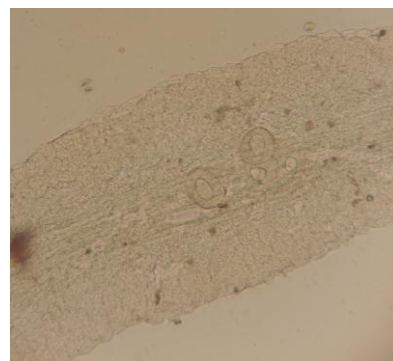
TINCIÓN CON ACETO CARMIN



OBSERVACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO



OBSERVACIÓN DE TEJIDO TESTICULAR



OBSERVACIÓN DE TEJIDO TESTICULAR CON INCLUSION DE TEJIDO OVARICO

## ANEXO 2: Preparación de muestras de gónadas método Aceto - Carmín

### **ANEXO 3: Preparación de láminas histológicas.**

Metodología aplicada en el Laboratorio de Embriología, Histología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

#### **• Fijación de muestras**

Inmediatamente de obtenidas las muestras se procedieron a fijar cada una de ellas con formalina bufferada al 10% para conservar la estructura morfológica y química de las células y tejidos que permite realizar posteriormente los procedimientos de coloración.

#### **• Deshidratación**

Se realizó con el objetivo de eliminar el agua intra y extracelular para lo cual se debe deshidratar sumergiéndolo las muestras en líquidos anhidros, ávidos de agua. Se utilizaron alcoholes de distinta concentración.

- Alcohol etílico al 70 por 100 1 hora
- Alcohol etílico al 80 por 100 1 hora
- Alcohol etílico al 95 por 100 1 hora
- Alcohol etílico al 100 por 100 1 hora
- Alcohol etílico al 100 por 100 1 hora
- Alcohol etílico al 100 por 100 1 hora

#### **• Aclaración**

Este procedimiento permite que el alcohol de los tejidos sea reemplazado por un líquido que disuelva la parafina con la cual el tejido va a ser impregnado y tiene la propiedad de volver transparente a las muestras, para ello se utilizó el xilol continuando con el siguiente proceso:

- Xilol 1 1 hora
- Xilol 2 1 hora
- Xilol 3 1 hora



## • **Inclusión**

Este proceso comprende la impregnación de las muestras con un medio que llene todas las cavidades naturales, espacios e intersticios tisulares y aun los espacios intracelulares y, que proporcione la consistencia firme, necesaria para hacer los cortes bastantes delgados sin provocar distorsión, otra ventaja más es la maniobra de encerrarlos en un bloque de parafina permitiendo manejar y fijar la muestra al micrótopo sin dañar la muestra, siendo el método de la parafina el más simple y el más común que se utilizó para lograr el objetivo siguiendo el siguiente proceso:

- Parafina líquida I 1 hora
- Parafina líquida II 2 horas

Posteriormente cada una de las muestras se colocó en el centro de un molde con parafina, se dejó reposar en el medio ambiente hasta que se solidifique.

## • **Corte de la muestra**

Para el corte de las muestras se utilizó el micrótopo de deslizamiento verificando que el micrótopo esté ajustado para el grosor de 5 $\mu$ m - 6 $\mu$ m, se colocó el bloque de parafina conteniendo la muestra y se comenzó el corte con impulsos regulares.

Luego se tomaron las láminas de parafina cortadas con el micrótopo conteniendo las muestras y se hizo flotar en un recipiente de agua a temperatura ambiente para quitar el excedente de parafina. Se introdujo al recipiente una laminilla la cual se levantó suavemente con un movimiento uniforme, al tocar el borde de la muestra, ésta se adhirió a ella. Se retiró del recipiente y se dejó escurrir la laminilla con la muestra impregnada a un ángulo de 60 grados aproximadamente durante dos a cinco minutos.

## • **Secado de cortes**

Los cortes de las muestras se colocaron en una estufa a temperaturas entre 37°C y 40°C durante toda la noche. El secado permite que desaparezca toda huella de agua entre el corte y el portaobjetos.

- **Tinción de cortes**

La tinción utilizada fue Hematoxilina Eosina (H-E). La hematoxilina permite observar las estructuras físicas del núcleo, y la eosina permite distinguir los detalles del citoplasma de las células.

## ANEXO 4: Modelo lineal general

### Modelo lineal general: Increm long\_ . Increm Peso vs. Tratamiento

Factor Tipo Niveles Valores  
Tratamiento fijo 5 C0. C1. T1. T2. T3

Análisis de varianza para Increm long\_ (mm), utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Tratamiento	4	6,933	6,933	1,733	1,08	0,415
Error	10	16,000	16,000	1,600		
Total	14	22,933				

S = 1,26491 R-cuad. = 30,23% R-cuad.(ajustado) = 2,33%

Análisis de varianza para Increm Peso \_(g), utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Tratamiento	4	0,016594	0,016594	0,004149	1,76	0,213
Error	10	0,023565	0,023565	0,002356		
Total	14	0,040159				

S = 0,0485436 R-cuad. = 41,32% R-cuad.(ajustado) = 17,85%

Observaciones inusuales de Increm Peso \_(g)

Increm	Residuo				
Obs	Peso _(g)	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	estándar
14	0,224079	0,305681	0,028027	-0,081602	-2,06 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

## Prueba de Kruskal-Wallis: Nro\_fin vs. Tratamiento

Prueba de Kruskal-Wallis en Nro\_fin

Tratamiento	N	Clasificación		Z
		Mediana	del promedio	
C0	3	77,00	8,5	0,22
C1	3	57,00	6,0	-0,87
T1	3	77,00	10,0	0,87
T2	3	79,00	10,8	1,23
T3	3	64,00	4,7	-1,44
General	15		8,0	

H = 4,11 GL = 4 P = 0,392

H = 4,12 GL = 4 P = 0,390 (ajustados para los vínculos)

\* NOTA \* Una o más muestras pequeñas

## Modelo lineal general: long\_fin. peso\_fin vs. Tratamiento

Factor Tipo Niveles Valores  
Tratamiento fijo 5 C0. C1. T1. T2. T3

Análisis de varianza para long\_fin, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Tratamiento	4	6,933	6,933	1,733	1,08	0,415
Error	10	16,000	16,000	1,600		
Total	14	22,933				

S = 1,26491 R-cuad. = 30,23% R-cuad.(ajustado) = 2,33%

Análisis de varianza para peso\_fin, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Tratamiento	4	0,016594	0,016594	0,004149	1,76	0,213
Error	10	0,023565	0,023565	0,002356		
Total	14	0,040159				

S = 0,0485436 R-cuad. = 41,32% R-cuad.(ajustado) = 17,85%

Observaciones inusuales de peso\_fin

Residuo					
Obs	peso_fin	Ajuste	EE de ajuste	Residuo	estándar
14	0,231579	0,313181	0,028027	-0,081602	-2,06 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

## ANEXO 5: Prueba de proporciones

Tratamiento	Proporción Machos
T1	0.909090909
T2	1
T3	0.958333333
CO	0.8
C	0.730769231

1. Ver si todos los tratamientos producen la misma proporción de machos

Tratamiento 1 es igual al tratamiento 2?

### Prueba e IC para dos proporciones

Muestra X N Muestra p

1 30 33 0.909091

2 32 32 1.000000

Diferencia =  $p(1) - p(2)$

Estimado de la diferencia: -0.0909091

IC de 95% para la diferencia: (-0.188993, 0.00717497)

Prueba para la diferencia = 0 vs. no = 0:  $Z = -1.82$  Valor P = 0.069

A un nivel de significación de 0.05 existe evidencia estadística para afirmar que los dos tratamientos producen la misma cantidad de machos.

Tratamiento 1 es igual al tratamiento 3?

### Prueba e IC para dos proporciones

Muestra X N Muestra p

1 30 33 0.909091

3 23 24 0.958333

Diferencia =  $p(1) - p(2)$

Estimado de la diferencia: -0.0492424

IC de 95% para la diferencia: (-0.175780, 0.0772953)

Prueba para la diferencia = 0 vs. no = 0:  $Z = -0.76$  Valor  $P = 0.446$

A un nivel de significación de 0.05 existe evidencia estadística para afirmar que los dos tratamientos producen la misma cantidad de machos.

Tratamiento 2 es igual al tratamiento 3?

### Prueba e IC para dos proporciones

Muestra	X	N	Muestra	p
---------	---	---	---------	---

2	32	32	1.000000
---	----	----	----------

3	23	23	1.000000
---	----	----	----------

Diferencia =  $p(1) - p(2)$

Estimado de la diferencia: 0

IC de 95% para la diferencia: (\*, \*)

Prueba para la diferencia = 0 vs. no = 0:  $Z = *$  Valor  $P = *$

A un nivel de significación de 0.05 existe evidencia estadística para afirmar que los dos tratamientos producen la misma cantidad de machos.

2. Verificar si con C0 se obtiene 50% de machos

### Prueba e IC para una proporción

Prueba de  $p = 0.5$  vs.  $p \text{ no} = 0.5$

Valor  $P$

Muestra	X	N	Muestra	p	IC de 95%	exacto
---------	---	---	---------	---	-----------	--------

Co	16	36	0.444444	(0.279354, 0.619023)	0.618
----	----	----	----------	----------------------	-------

A un nivel de significación de 0.05 existe evidencia estadística para afirmar que el tratamiento C0 produce el 50% de machos.

3. verificar si los tres tratamientos son mejores (mayor porcentaje de machos obtenidos) que el control C.

### **Prueba e IC para dos proporciones**

Muestra	X	N	Muestra p
T1,T2, T3	85	89	0.955056
C	19	28	0.678571

Diferencia =  $p(1) - p(2)$

Estimado de la diferencia: 0.276485

Límite inferior 95% de la diferencia: 0.126884

Prueba para la diferencia = 0 vs.  $> 0$ :  $Z = 3.04$  Valor P = 0.001

A un nivel de significación de 0.05 existe evidencia estadística para afirmar que los tres tratamientos producen mayor cantidad de machos que el tratamiento control.