CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN ACUICULTURA

IMARPE

Diferenciación sexual del lenguado de California *Paralichthys californicus* y control de la proporción sexual mediante la utilización de la hormona 17β-estradiol

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

Presenta:

Melissa Montes Montes

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por

Melissa Montes Montes

y aprobada por el siguiente comité

_____
Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director del Comité

_____
Dr. Miguel Ángel del Rio Portilla
Miembro del Comité

_____
Dr. Ernesto García Mendoza
Miembro del Comité

_____
Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador del Posgrado
en Ciencias en Acuicultura

_____
Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Agosto, 2014

IMARPE

Resumen de la tesis presentada por **Melissa Montes Montes**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Diferenciación sexual del Lenguado de California *Paralichthys californicus* y control de la proporción sexual mediante la utilización de la hormona 17β-estradiol

Resumen aprobado por:

_____

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de Tesis

El lenguado de California *Paralichthys californicus* es una especie con alto valor comercial debido a su gran tamaño y calidad de su carne. Esta especie presenta dimorfismo sexual en el crecimiento donde las hembras crecen más rápido que los machos, por lo tanto el cultivo monosexual de hembras resulta favorable para la producción. En el presente estudio se registró el proceso de diferenciación sexual mediante cortes histológicos de las larvas y gónadas del lenguado de California asimismo se probó el efecto de diferentes concentraciones de 17β-estradiol (E2) (2.5, 5 y 10 mg/kg) a través de la dieta para incrementar la proporción de hembras en el cultivo. A los 25 días después de la eclosión (DDE) se observó el primordio gonadal en ejemplares con una longitud total promedio de 6.96 ± 0.92 mm, hasta el día 75 DDE (37.58 ± 6.58 mm) se observó una gónada indiferenciada evidenciada por la presencia de células germinales primordiales. La primera evidencia de diferenciación se registró a los 115 DDE (55.93 ± 14.67 mm) donde se observó la cavidad ovárica y posteriormente a los 180 DDE (115.70 ± 17.02 mm) se evidencian ovarios con ovocitos en crecimiento y testículos con espermátidas. Por lo tanto, el periodo lábil para la diferenciación sexual se encuentra entre los días 75 y 115 después de la eclosión. Por otro lado, el suministro de E2 a través de la dieta a concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/kg incrementó el porcentaje de hembras de 26.67% (control, no adición de E2) a un 100% en todos los tratamientos. Se encontraron diferencias en la proporción de los tipos celulares (ovogonias, ovocitos primarios en fase I y II) entre el control y los tratamientos mientras que no se registraron alteraciones histológicas como atrofia gonadal en ninguno de los casos.

Palabras Clave: **diferenciación sexual, *Paralichthys californicus*, 17β-estradiol**

IMARPE

Abstract of the thesis presented by **Melissa Montes Montes** presented as partial requirement to obtain the degree of Master of Science in Aquaculture.

Gonadal sex differentiation of the California Halibut, *Paralichthys californicus,* and control of the sex ratio by using hormone 17β-estradiol

Abstract approved by:

_____
Dr. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Director

The California halibut *Paralichthys californicus* is a species with a high commercial value due to its large size and meat quality. This species present sexual growth dimorphism in which females grow faster than males, so all-female stocks are favorable for production. In this study the process of gonadal sex differentiation was documented by histological sections of larvae and gonad of California halibut and evaluated the effect of different concentrations of 17β-estradiol (E2) administered through the diet to increase the female sex ratio. At 25 days post-hatchery (dph), the fish total length average was of 6.96 ± 0.92 mm and gonadal primordium was observed, until day 75 dph (37.58 ± 6.58 mm) an undifferentiated gonad evidenced by the presence of primordial germ cells was observed. The first evidence of differentiation was recorded at 115 dph (55.93 ± 14.67 mm) where the ovarian cavity was observed and subsequently at 180 dph (115.70 ± 17.02 mm); oocytes and spermatids were observed in the ovaries and testes respectively. Therefore, the labile period for sex differentiation is between 75 and 115 DDE. Furthermore, treatment with E2 through the diet at concentrations of 2.5, 5 and 10 mg / kg increased the percentage of females from 26.67% in controls females to 100% in all treatments. There were differences in the proportion of cell types (oogonia, primary oocytes in stage I and II) between control and treatments while no histological alterations such gonadal atrophy were recorded in any of the cases.

Keywords: **Gonadal sex differentiation, *Paralichthys californicus*, 17β-estradiol**

IMAFPE

Dedicatoria

A toda mi familia, quienes son mi inspiración para salir siempre adelante. Son lo más importante en mi vida y a pesar de la distancia y el tiempo siempre los tuve presente en todo momento. Sus palabras y mensajes me ayudaron a continuar este camino que me permitió crecer no solo en lo profesional sino en lo personal.

IMARPE

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. Benjamín Barón Sevilla por sus grandes enseñanzas que me permitieron enriquecer el conocimiento además por la paciencia y el apoyo brindado durante todo el desarrollo del trabajo de la tesis.

A mis sinodales, Dr. Miguel Ángel del Río Portilla y Dr. Ernesto García Mendoza, por su ayuda, consejos y aportes durante el desarrollo de este trabajo.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por aceptarme en el programa de maestría, al Proyecto Control de la Producción de Peces Marinos Nº 623149 del Departamento de Acuicultura por los recursos financieros para el desarrollo de este estudio y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

A los investigadores del departamento de Acuicultura, Dra. Beatriz Cordero, Dra. Mónica Hernández, Dra. Carmen Paniagua, Dr. Manuel Segovia, Dr. Miguel Ángel del Río, Dr. Eugenio Díaz por su apoyo, consejo y sus enseñanzas.

A todos los técnicos del departamento de Acuicultura, en especial a Jesús y Uvi del laboratorio de peces marinos por su apoyo durante la fase experimental.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, por el apoyo técnico en la preparación y montaje de los cortes histológicos.

A mi gran amigo Jonathan porque fue mi colaborador, mano derecha y me apoyó incondicionalmente durante la fase experimental.

A mis compañeros y amigos de generación, Shava, Brenda, Vincent, Miguel, Jorge, Berna, Anaid, Fabi, Montse, Paty, Julio por el apoyo y compañía, por estar para conversar, salir, jugar y sobre todo desestresarnos cuando estábamos a punto de colapsar con la tesis. Gracias a todos y les deseo lo mejor.

Y a todas mis amigas y amigos, gracias por compartir esta nueva experiencia conmigo y brindarme su apoyo en todo momento.

IIMARPE

Contenido

	Página
Resumen español ……..……..……..	i
Resumen inglés……..……..……	ii
Dedicatoria ……..……..……..	iii
Agradecimientos……..……..……..	iv
Lista de Figuras……..……..……	vii
Lista de Tablas……..……..……..	x
1. Introducción	
1.1. Lenguado California ……..……	1
1.2. Determinación y diferenciación sexual	
1.2.1. Determinación del sexo…….....	4
1.2.2. Diferenciación sexual …….....	5
1.3. Efecto de los factores extrínsecos en la determinación y diferenciación del sexo	
1.3.1. Temperatura ……	7
1.3.2. Esteroides exógenos …….....	9
1.4. Gonadogénesis	
1.4.1. Células Germinales primordiales …….	12
1.4.2. Diferenciación testicular y espermatogénesis…….	13
1.4.3. Diferenciación ovárica y ovogénesis…….	14
1.5. Justificación……..	17
1.6. Hipótesis……	18
1.7. Objetivos……	19
2. Materiales y métodos	
2.1. Protocolo de cultivo para el experimento……	20
2.2. Bioensayo para el control de la proporción sexual……..	
2.2.1. Enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con 17β-estradiol	22
2.2.2. Enriquecimiento del alimento formulado con la hormona 17β-estradiol……..	23
2.2.3. Verificación de la concentración de la hormona en el alimento	23
2.3. Descripción de la génesis gonadal e identificación del sexo	24
2.4. Identificación del periodo lábil para la diferenciación sexual	26
3. Resultados	
3.1. Cultivo de larvas y juveniles de lenguado……	27
3.2. Descripción de la génesis gonadal……	31
3.3. Evaluación de la concentración de esteroides……..	46
3.4. Evaluación de la proporción sexual……...	48

IMARPE

Contenido (continuación)

4. Discusión……. 50
5. Conclusiones...……..……. 64
6. Recomendaciones…… 65

Lista de referencias…….. 66

Apéndices…… 74

IMARPE

Lista de figuras

Figura		Página
1	Diagrama que ilustra el concepto de periodo lábil para la diferenciación sexual (Piferrer, 2001)……	5
2	Patrones de la determinación del sexo dependiente de la temperatura (TSD) en los peces (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008)…….....	8
3	Crecimiento en longitud total promedio de lenguado de California *Paralichthys californicus* tratado con cuatro concentraciones 17-β estradiol, 0 (control), 2.5 (T1), 5 (T2) y 10 (T3) mg/kg de alimento, de los 25 a los 115 DDE. Las líneas verticales expresan la desviación estándar…….	28
4	Efecto del 17-β estradiol suministrado a través de la dieta sobre la longitud total del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 115 DDE (F= 0.58, p>0.05)……..	29
5	Juveniles de lenguado de California, *Paralichthys californicus* de 125 DDE con lesiones en la piel……..	30
6	Ubicación de la gónada con respecto a la cavidad abdominal en una larva de lenguado de California *Paralichthys californicus* de 25 DDE…….	31
7	A, Corte histológico de la región abdominal del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 25 DDE. B, Primordio gonadal ubicado en posición adyacente al peritoneo, al intestino y cercano a la región final del riñón. CGP: célula germinal primordial, R: riñón, E: estómago, M: músculo, PG: primordio gonadal, P: peritoneo y TI: Tejido intestinal……...	33

IMARPE

Lista de figuras (continuación)

8 A, Corte histológico de la región abdominal del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 35 DDE. B, Primordio gonadal ubicado entre el riñón y el intestino. CGP: célula germinal primordial, G: gónada, I: intestino M: músculo y P: peritoneo…… 35

9 A, Corte histológico de la región abdominal del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 75 DDE. B, Gónada colonizada por células germinales primordiales. I: intestino, M: músculo, G: gónada y CGP: células germinales primordiales….. 37

10 A, Corte histológico del ovario del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 115 DDE. B, Detalle de la cavidad ovárica. CO: cavidad ovárica y Og: ovogonias…… 39

11 Ubicación de la gónada del lenguado de California *P. Californicus*, en la cavidad abdominal, se indica su posición posterior con respecto al extremo distal del riñón. La imagen corresponde a un lenguado de 180 DDE preservado en solución fijadora…… 40

12 A, Corte histológico del ovario del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 180 DDE. B, Detalle del ovario. CO: cavidad ovárica, Og: ovogonias, Oi: ovocitos primarios en fase I, Oii: ovocitos primarios en fase II…… 42

13 A, Corte histológico del testículo del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 180 DDE. B, Detalle del testículo. EC: espermatocistos, ES: espermatogonias, ESP: espermatocitos, ESPD: espermátidas…….. 44

14 Estadios de diferenciación ovárica en comparación con longitud total (mm) del lenguado de California *Paralichthys californicus*. Etapas son: Ind, gónada indiferenciada; CO, cavidad ovárica; Oo: Ovocitos primarios (Fase I y II)……... 45

IMARPE

Lista de figuras (continuación)

15 Proporción de ovocitos en diferentes estados de diferenciación celular en las larvas de lenguado de California *Paralichthys californicus* de 180 DDE, tratadas con cuatro concentraciones de 17-β estradiol, 0 (control), 2.5 (T1), 5 (T2) y 10 (T3) mg/kg de alimento. Og: ovogonias, Oi: ovocitos primarios en fase I, Oii: ovocitos primarios en fase II…….. 49

IMARPE

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Características fisicoquímicas del medio de cultivo de lenguado de california *Paralichthys californicus*. Valores: media ± desviación estándar…….	27
2	Concentración de E2 en el alimento suministrado a larvas de lenguado de California *Paralichthys californicus*…..…….	46
3	Concentración de E2 y 11-KT en larvas de lenguado de California *Paralichthys californicus*……	47
4	Proporción sexual de los juveniles de lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 180 DDE, tratados con diferentes concentraciones de E2……	48

IMARPE

1. Introducción

1.1. Lenguado de California

El lenguado de California *Paralichthys californicus* es la especie más grande de la familia *Paralichthyidae,* alcanza una longitud total de 152 cm y un peso de 33 kg (Eschmeyer et al., 1983). Su distribución geográfica comprende desde la desembocadura del río Quillayute en Washington, EE. UU., hasta bahía Magdalena en Baja California Sur, México (Miller y Lea, 1972). Esta especie se caracteriza por poseer el cuerpo aplanado con forma oval, cabeza y ojos pequeños y una gran boca simétrica (Allen et al., 1990). Otras características son la presencia de un arco muy pronunciado en la línea lateral que rodea a la aleta pectoral sobre la región dorsal del cuerpo. La coloración es marrón verdoso, a veces moteado y con pequeñas manchas blancas del lado ocular (Barnhart, 1936).

El lenguado de California es un organismo gonocórico sin dimorfismo sexual externo, sin embargo existen diferencias específicas del sexo en la edad, tamaño, madurez y distribución. Las hembras, en comparación con los machos, alcanzan una mayor edad y longitud total, maduran más tarde y son más abundantes en las zonas costeras (Sunada et al., 2001). El periodo reproductivo del lenguado de California se extiende desde febrero hasta agosto (Frey, 1971). El tipo de fertilización es externa y los huevos producidos se encuentran en la columna de agua cerca de la costa por lo cual se les cataloga como pelágicos (Allen et al., 1990).

Por otro lado, la pesquería de este recurso es importante ya que es considerado de alto valor comercial para las zonas del sur de California (EE. UU) y la costa norte del Pacífico de México (Kucas et al., 1986). Ish y Stroman (2006) estudiaron las capturas del lenguado de California realizadas tanto en aguas Mexicanas como en el Estado de California, EE.UU por la flota estadounidense, entre los años 1916 y

IMARPE

2001, registraron una disminución de las capturas, de 2000 a 400 toneladas en dicho periodo.

En México, la pesquería de esta especie es artesanal, se realiza en embarcaciones pequeñas con poca autonomía y se utiliza como arte de pesca la red agallera de fondo (SAGARPA, 2012b). A pesar de ser una especie de importancia económica, los registros de sus capturas en México no están completamente documentados, los datos consignados en las estadísticas pesqueras a partir del año 2002 al 2011, incluyen el volumen de las capturas de todas las especies de lenguados y oscila entre las 2 y 3 mil toneladas, mientras que para el estado de Baja California el volumen es de 200 a 400 toneladas anuales (CONAPESCA, 2002 - 2011).

Debido a la reducción en las poblaciones de esta especie y a sus características particulares, que estimulan su demanda en el mercado regional (en el noroeste de México y en California, USA), como su gran tamaño, la calidad de su carne y su alto valor comercial; su cultivo se considera potencial y atractivo para el mercado. En tal sentido, varios grupos de investigación en EE.UU dedicaron un esfuerzo importante para desarrollar las técnicas de cultivo de esta especie, por ejemplo el criadero Redondo Beach en el estado de California donde se mantienen reproductores que desovan habitualmente (Conklin et al., 2003). Mientras que en México surgieron los primeros intentos por parte del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), con la instalación de la Unidad de Producción de Semilla de Lenguado perteneciente al Departamento de Acuicultura (SAGARPA, 2012a).

Asimismo, entre los años 1995 y 2010, la empresa Pesco S.A. de C.V. en alianza con la Unidad de Producción de Semilla de Lenguado del Departamento de Acuicultura del CICESE y con el auspicio de la Comisión Nacional de Pesca y Acuacultura, desarrolló el cultivo de lenguado de California a escala comercial. No obstante a los resultados positivos de esta experiencia, uno de los problemas que limitaron su éxito, fue la tasa de crecimiento, que resultó muy lenta, ya que en un plazo de un año, los lenguados sólo alcanzaron los 500 g.

IMARPE

No obstante, la tasa de crecimiento se puede mejorar si se toma ventaja de la diferencia en la tasa de crecimiento de las hembras, que es más rápida que en los machos (Hobbs et al., 1990). De forma similar, esta diferencia intersexual del crecimiento se ha registrado en otras especies de peces planos como *Limanda limanda* (Lozán, 1992), *Verasper moseri* (Mori et al., 1999), *Hippoglossus hippoglossus* (Björnsson, 1994) y *Paralichthys olivaceus* (Yoneda et al., 2007). Por lo cual, el cultivo comercial de los lenguados a escala mundial trata de incrementar su producción mediante la obtención de cultivos monosexuales de hembras (Yamamoto, 1999).

1.2. Determinación y diferenciación sexual

Los peces son un grupo de vertebrados muy diverso, lo que se refleja en su morfología, tipos de hábitat, alimentación, comportamiento y formas de reproducción (Piferrer, 2009). Dentro de esta diversidad biológica muchas especies tienen dimorfismo sexual en el crecimiento, la edad de la madurez, los caracteres sexuales secundarios y otras características morfológicas y conductuales (Penman y Piferrer, 2008). Estas diferencias en el sexo son ventajosas para la economía de la producción acuícola de alimentos para el consumo humano y en el cultivo de peces ornamentales, lo que ha dado lugar a la búsqueda del control de las proporciones sexuales con la finalidad que el productor obtenga poblaciones de un solo sexo con una característica en particular (Penman y Piferrer, 2008).

IMARPE

El control de la proporción sexual se considera como unas de las estrategias más prometedoras cuando unos de los sexos se considera más ventajoso por sus características particulares lo que permite mejorar la producción y la rentabilidad de su cultivo (Strussmann y Nakamura, 2002). Sin embargo, para lograr con éxito un cultivo monosexo, es importante ahondar en el conocimiento de los mecanismos asociados a los procesos de determinación y diferenciación sexual, ya que la proporción sexual depende de la combinación de dichos procesos (Piferrer, 2009).

La determinación del sexo define el proceso de la diferenciación sexual y por lo tanto establece la forma en que se desarrollará el sexo (hembra o macho) de un

organismo, mientras que la diferenciación sexual es el proceso por el cual se desarrolla el primordio de la gónada y se transforma en un ovario o un testículo (Devlin y Nagahama, 2002; Penman y Piferrer, 2008). Pandian y Koteeswaran (1999) consideran que ambos procesos son lábiles y susceptibles a manipulación, por ejemplo mediante hormonas, temperatura u otros factores ambientales.

La manipulación del sexo mediante la utilización de esteroides exógenos (hormonas), es una estrategia del control que permite dirigir la diferenciación sexual hacia el sexo deseado, de tal manera que la feminización de una progenie se puede lograr utilizando estrógenos como el 17β–estradiol (1,3,5,(10)-estratriene-3,17b-diol) mientras que la masculinización con andrógenos como la testosterona (17b-hydroxy-4-androsten-3-one) (Baroiller et al., 1999).

1.2.1. Determinación del sexo

IMARPE

La determinación del sexo se puede definir como la suma de los elementos genéticos que son responsables de la existencia de las gónadas (Piferrer, 2001). En los peces gonocóricos, el desarrollo de los primordios de las gónadas en algunos casos es lábil, pero cuando ya se ha establecido el sexo del individuo, el estado de diferenciación gonadal se mantiene estable durante el resto de la vida (Devlin y Nagahama, 2002).

En la mayoría de los vertebrados la determinación del sexo se da al momento de la fertilización, por la herencia de los cromosomas sexuales (Luckenbach et al., 2003). Sin embargo en los peces, la determinación del sexo puede ser genético (GSD, por sus siglas en Inglés *Genetic sex determination*) o puede ser dependiente del ambiente (ESD, por sus siglas en Inglés *Enviromental sex determination*) (Devlin y Nagahama, 2002).

En la GSD, el sexo está determinado por la combinación hereditaria de genes (Devlin y Nagahama, 2002) y puede ser cromosómica o poligénica (Piferrer, 2001). El modelo cromosómico está referido a la presencia de los cromosomas sexuales, siendo los sistemas cromosómicos más comunes *XX/XY y WZ/ZZ* (Tave, 1993). Mientras que el modelo poligénico se basa en la combinación de los factores

masculinos y femeninos (genes determinantes), presentes en los cromosomas heredados de cada parental, ya que no hay cromosomas sexuales (Piferrer, 2001).

En la ESD, la diferenciación del sexo depende de factores extrínsecos, tales como la temperatura del agua, el pH y de esteroides sexuales exógenos o sustancias contaminantes, entre otros (Baroiller et al., 2002).

1.2.2. Diferenciación sexual

La diferenciación sexual ocurre una vez que se ha determinado el sexo (Devlin y Nagahama, 2002) e involucra todos los procesos que se producen durante el desarrollo, permitiendo la expresión fenotípica del sexo (Piferrer, 2001).

La diferenciación sexual involucra un *periodo lábil*, durante el cual se llevan a cabo los procesos que determinan el curso de la diferenciación sexual hacia un fenotipo particular, durante este periodo las células germinales primordiales (CGPs, conjunto de células indiferenciadas que dan origen a los gametos) son sensibles a diferentes factores intrínsecos y extrínsecos (Piferrer, 2001). Este proceso morfogenético ocurre antes de la diferenciación morfológica o histológica de la gónada (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002) (Figura 1) y, se produce en un momento particular del desarrollo y es especie específico (Devlin y Nagahama, 2002).

IMARPE

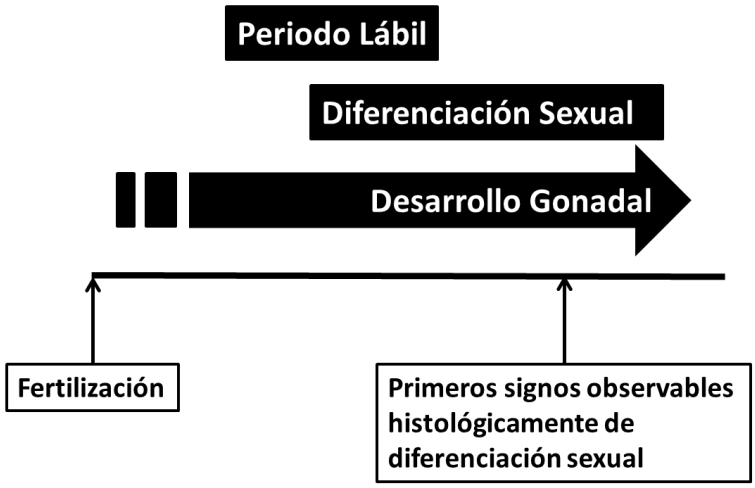


Figura 1. Diagrama que ilustra el concepto de periodo lábil para la diferenciación sexual. Tomado de Piferrer (2001).

El crecimiento y diferenciación de la gónada requieren que exista una intercomunicación con los tejidos no adyacentes, a través de controles paracrinos y endocrinos, los cuales son específicos para cada fenotipo sexual (Devlin y Nagahama, 2002). El control endocrino de la reproducción implica una interacción entre el cerebro y las gónadas, por medio de la producción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producidas en el hipotálamo y que a su vez regulan la síntesis y liberación de gonadotropinas derivadas de la pituitaria (GtHs). La GtHs estimulan la síntesis y liberación de los esteroides sexuales en células específicas de las gónadas y el cerebro, el tipo de esteroides y sus concentraciones dependen del sexo, en las hembras predominan los estrógenos, en tanto que en los machos los andrógenos (Nagahama, 1994).

Los esteroides sexuales se producen en las células somáticas de las gónadas donde actúan como hormonas endocrinas y controlan el desarrollo de las CGPs, propiciando la diferenciación sexual a través de receptores específicos en las células diana (Devlin y Nagahama, 2002). Además, el conocimiento de la dinámica de la concentración de los esteroides sexuales permite no solo identificar el sexo de los organismos, sino identificar también el periodo lábil de la diferenciación sexual.

IMARPE

Numerosas hormonas no esteroideas están involucrados en la diferenciación de las gónadas, pero las hormonas esteroideas tienen una función preponderante, ya que son los inductores naturales de la diferenciación sexual en los peces (Piferrer, 2001). Entre las hormonas esteroides se encuentran los andrógenos, como la testosterona (T) y 11-cetotestosterona (11KT), y los estrógenos, como el 17β-estradiol (E2) (Devlin y Nagahama, 2002). La diferenciación de las hembras es una consecuencia de los altos niveles del esteroide sexual E2, el cual induce y mantiene el desarrollo ovárico (Yamamoto, 1969). Mientras que para la diferenciación de machos, los andrógenos responsables son la T y 11-KT (Nagahama, 1994).

La biosíntesis de los esteroides sexuales depende de una compleja serie de enzimas (Nagahama, 1994), donde la citocromo P450 aromatasa (P450arom), que

es una enzima esteroidogénica (Kitano et al., 1999), responsable de la conversión de esteroides C19 (por ejemplo, la testosterona) a estrógenos (Luckenbach et al., 2005). El gen que codifica para esta enzima es el CYP19, el cual posee dos isoformas, a las cuales se les ha denominado cyp19a1a y cyp19a1b, que se encuentran ubicadas en el ovario y cerebro respectivamente (Luckenbach et al., 2005; Luckenbach et al., 2009). Por lo tanto, la expresión y actividad de la P450arom derivada del ovario resulta en la biosíntesis de E2 en las gónadas, lo cual induce el proceso de diferenciación ovárica (Kitano et al., 1999).

La presencia de hormonas sexuales se ha estudiado en diferentes especies, evaluando los cambios en la concentración de T, E2 y 11-KT durante y después de la diferenciación sexual. En la perca, *Perca fluviatilis*, se estudió la dinámica de la concentración de los esteroides sexuales durante la embriogénesis y su relación con la diferenciación sexual, los resultados del estudio indicaron que la 11-KT tiene una función importante en el proceso de diferenciación masculina (Rougeot et al., 2007). En el lenguado japonés, *Paralichthys olivaceus*, se evaluó la dinámica de los esteroides sexuales, y resultó que los niveles de T disminuyen durante la diferenciación gonadal y se incrementan ligeramente al inicio de la diferenciación del ovario. Por otro lado, los niveles de E2 aumentan gradualmente hasta un punto máximo, cuando inicia la diferenciación ovárica, lo que permite identificar el periodo lábil para esta especie alrededor de los días 60-66 después de la eclosión (Sun et al., 2010).

IMARPE

1.3. Efecto de los factores extrínsecos en la determinación y diferenciación del sexo

1.3.1. Temperatura

El principal factor ambiental que afecta el proceso de diferenciación del sexo es la temperatura y los organismos que son sensibles a este factor tienen un sistema de determinación sexual dependiente de la temperatura (TSD por sus siglas en Inglés *Temperature-dependent sex determination*) (Baroiller y D'Cotta, 2001). La TSD se produce cuando la temperatura determina la dirección de la diferenciación sexual, por lo tanto influye en el sexo fenotípico del animal (Luckenbach et al., 2009). Este

modo de determinación se evidenció por primera vez en la sardina atlántica *Menidia menidia* (Atherinopsidae) y posteriormente se ha registrado en 59 especies de peces, en su mayoría especies de las familias Apistogramma y Cichlidae, entre otras (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008).

En los peces se han observado tres patrones de TSD: (A) a mayores temperaturas la proporción de machos es mayor, este patrón se ha registrado en familias como Poecilidae, Cichlidae, Pleuronectidae y Cyprinidae; (B) a mayores temperaturas la proporción de hembras es mayor y se ha registrado en el bagre de canal *Ictalurus punctatus*; y (C) a altas y bajas temperaturas la proporción de machos es mayor, el cual se ha registrado en los lenguados del género *Paralichthys* (Figura 2) (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008; Luckenbach et al., 2009).

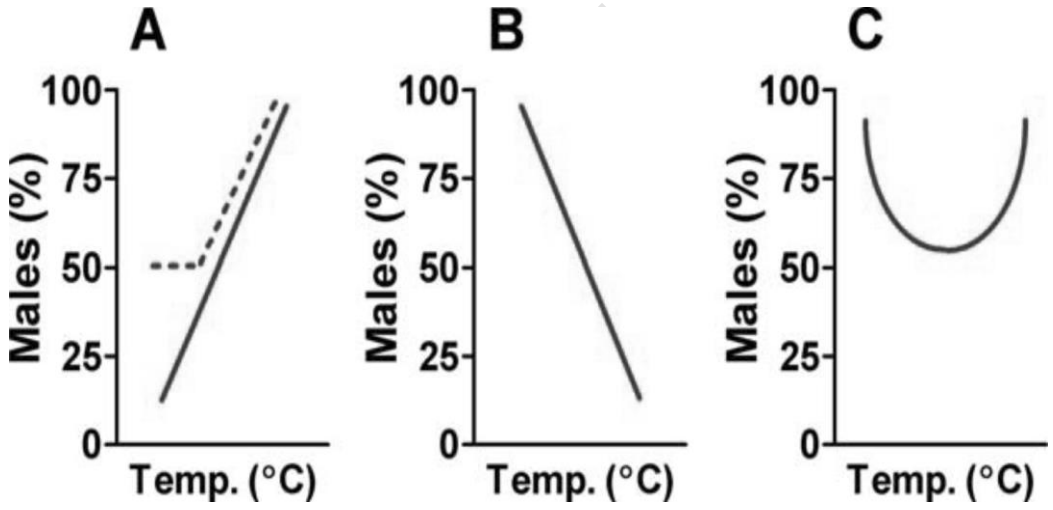


Figura 2. Patrones de la determinación del sexo dependiente de la temperatura (TSD) en los peces. Tomado de Ospina-Álvarez y Piferrer (2008).

En los peces planos se han registrado los patrones de TSD A y C (Figura 2), por ejemplo en la especie *V. moseri* la proporción de sexos a una temperatura de 14ºC fue de 1:1 mientras que a 18ºC se desarrollan un 100% de machos (Goto et al., 1999). Resultados similares se encontraron en *L. yokohamae*, donde a una temperatura de 15ºC la proporción de sexos fue de 1:1, mientras que a 25ºC se desarrollaron un 82% de machos (Goto et al., 2000). Por lo tanto, en dichas especies se ha registrado el patrón A de TSD, es decir que la exposición a altas temperaturas antes y durante la diferenciación sexual aumenta significativamente la

proporción de machos. Sin embargo, estos resultados pueden deberse a lo limitado de las temperaturas probadas; por lo cual también es posible que a temperaturas más bajas (es decir, inferiores a lo probado), se registre el patrón C de TSD (Luckenbach et al., 2009).

En *P. olivaceus* se ha observado el patrón C, donde a temperaturas de 15 y 27.5ºC se desarrollaron el 80% de machos y a una temperatura intermedia de 20ºC la proporción sexual fue 1:1 (Yamamoto, 1999). De modo similar se observó que en *P. lethostigma*, las temperaturas de 18 y 28ºC se favorecieron la diferenciación de machos, en un porcentaje de 78 y 96 % respectivamente, en contraste, a una temperatura intermedia, se mantuvo la proporción sexual de 1:1 (Luckenbach et al., 2003). Finalmente Márquez-Reyes (2009), no pudo demostrar la influencia de la temperatura sobre la diferenciación de sexo en *P. californicus*, posiblemente debido al efecto adverso del estrés asociado a las condiciones de cultivo.

1.3.2. Esteroides exógenos

Los esteroides sexuales son los factores que de manera natural llevan a la diferenciación sexual, por lo que se han utilizado como un medio para el control del sexo (Piferrer, 2001). El uso de esteroides sexuales involucra una serie de variables, como el tipo y naturaleza de la hormona, la dosis, duración de la exposición y la vía de administración (Piferrer, 2001).

Para el control del sexo se pueden emplear esteroides feminizantes naturales (como 17β –estradiol, E2) o sintéticos (como el 17α– etinilestradiol, EE). Los esteroides más utilizados son los sintéticos, debido a que son relativamente más baratos y su eliminación es relativamente más lenta (Pandian y Sheela, 1995). La vía de administración puede ser por inyección, por inmersión o a través de la dieta, pero son los dos últimos métodos los que resultan más viables a nivel de la práctica comercial ya que el tratamiento se aplica de manera simultánea a un gran número de individuos. El método de inmersión es adecuado para las especies en las que el período lábil para la diferenciación sexual coincide con la embriogénesis o se produce durante la etapa larval, mientras que los tratamientos mediante la

IMARPE

alimentación son más apropiados para las especies en las que el período lábil coincide con la alimentación exógena (Piferrer, 2001).

La duración del tratamiento es otra variable importante, ya que la exposición al esteroide debe coincidir con el periodo lábil para la diferenciación. Por ejemplo, tratamientos breves durante este periodo pueden resultar en alteraciones permanentes en el fenotipo sexual, mientras que una vez que la gónada se ha diferenciado sexualmente, no se registran respuestas favorables, aunque los tratamientos sean prolongados (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

En los peces teleósteos, incluyendo a los peces planos, se han utilizado deferentes hormonas para el control del sexo. El método de administración más común ha sido a través de la dieta, ya que el periodo de la diferenciación sexual coincide con el momento en el que las larvas tienen la capacidad de consumir el alimento exógeno formulado lo cual facilita de inclusión de la hormona. Por ejemplo en el lenguado del Atlántico *Hippoglossus hippoglossus,* las larvas de 30 ± 5 mm fueron alimentados por un periodo de 45 días con alimento balanceado enriquecido con E2 a una concentración 10 mg/kg, resultando una progenie con 70-74% de hembras, mientras que con 17a-metildihidrotestosterona (MDHT; 1 and 5 ppm) entre 97 y 100% de machos (Hendry et al., 2003).

IMAPPE

En el lenguado *Scophthalmus maximus*, las larvas de 35 días después de eclosión (DDE) fueron alimentadas con una dieta enriquecida con MDHT y E2 a una concentración de 3 mg/kg durante 65 días y se obtuvieron 100% de machos y hembras en cada tratamiento (Haffray et al., 2009). En el lenguado japonés *Paralichthys olivaceus*, se obtuvieron 100% de hembras con un alimento enriquecido con E2 y suministrado durante los días 35 y 110 DDE (Sun et al., 2010). Mientras que en el lenguado senegalés, *Solea senegalensis* se obtuvieron un 50% de hembras con un alimento enriquecido con E2 a una concentración de 10 mg/kg, suministrado entre los 98 y 169 DDE, y hasta un 95% de machos con MDHT a 10 mg/kg (Viñas et al., 2013).

Por otro lado Guarneros-Orea (2012) utilizó la hormona E2 por el método de inmersión en el lenguado de California *Paralichthys californicus*, sin embargo no

pudo identificar organismos con gónadas diferenciadas en los tratamientos ya que la concentración de la hormona administrada (100 µg/l) ocasionó atrofia de la gónada. A pesar de ello, en el control donde los organismo no estuvieron expuestos a los esteroides se logró caracterizar el desarrollo gonadal y se postuló que el periodo lábil para diferenciación sexual se encuentra entre el día 29 y 158 DDE, basándose en la identificación de las células germinales en el primordio gonadal y el desarrollo de la cavidad ovárica, respectivamente. Debido justamente a que este periodo coincide con la alimentación exógena a base de alimento vivo (*Artemia*) y formulado (Coklin et al., 2003), se pueden aplicar tratamientos con esteroides, utilizando dichos alimentos como vehículo, para lograr la feminización de las larvas.

La forma más común de control del sexo es la alimentación con una dieta formulada enriquecida con esteroides, tal como se utilizado en las otras especies de peces planos. Aunque también se ha utilizado el alimento vivo (nauplios de *Artemia*) enriquecido con E2 (Stewart et al., 2001) en otras especies de teleósteos, donde la determinación del sexo coincide con dicho periodo de alimentación, como en el lumpo, *Cyclopterus lumpus*, en el cual se logró la feminización total de la progenie suministrando nauplios de *Artemia* enriquecidos con 231-407 ng de E2/mg peso seco durante los 5 y 24 DDE (Martin-Robichaud et al., 1994). De manera similar, en la lubina negra *Micropterus salmoides* se produjeron progenies 100% femeninas utilizando nauplios de *Artemia* enriquecida con E2 a una dosis de 5 mg/l durante 10 semanas DDE (Garret, 1989).

IMARPE

1.4. Gonadogénesis

El término gonadogénesis está referido al desarrollo de las gónadas, las cuales en los teleósteos al igual que en otros vertebrados se forman a partir de la coordinación entre dos tipos celulares distintos: el tipo germinal y el somático. La línea germinal compuesta por las células germinales primordiales (CGPs), se separa claramente de la línea somática, esta última se deriva del epitelio mesodérmico (peritoneo) durante el desarrollo temprano (Nakamura et al., 1998; Molyneaux y Wylie, 2004; Gilbert, 2006).

Las CGPs están presentes en todas las gónadas estudiadas tanto en teleósteos gonocóricos y hermafroditas, además son células bipotenciales capaces de diferenciarse en oogonios o espermatogonios. Este proceso de diferenciación es coordinado entre las células somáticas y las CGPs pero está controlado genéticamente y puede ser modificado por diferentes factores ambientales (Nakamura et al., 1998; Le Menn et al., 2007).

1.4.1. Células Germinales primordiales

Las CGPs se originan por dos diferentes mecanismos de especificación, por preformación o por epigénesis. La preformación es el mecanismo que incluye la existencia de determinantes prelocalizados en el huevo y son de herencia materna, ya sea antes o inmediatamente después de la fertilización. Por otro lado en la epigénesis, las células germinales se desarrollan en las crestas germinales y surgen como resultado de señales inductivas de los tejidos circundantes (Extavour y Akam, 2003).

IMARPE

Las CGPs pueden determinarse por la localización del plasma germinal, formado por determinantes maternos como proteínas citoplasmáticas y mRNAs, almacenados en el ovocito durante las primeras etapas de la ovogénesis (Gilbert, S.F., 2006). Esta determinación puede llevarse a cabo en diferentes grupos de animales como nemátodos (*Caenorhabditis* elegans), artrópodos (mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*) y cordados (anfibios como rana africana *Xenopus laevis*, teleósteos como pez zebra *Danio rerio*, medaka *Oryzias latipes*, bacalao *Gadus morhua*), debido a que el mecanismo de especificación de las células germinales en estos organismo es preformista; mientras que en los mamíferos es epigénetico (Extavour y Akam, 2003; Molyneaux y Wylie, 2004; Herpin et al., 2007; Presslauer et al., 2012).

Estas células se caracterizan por su gran tamaño con respecto a las células somáticas, forma ovalada, de contornos irregulares, con núcleos redondos situados excéntricamente y una alta relación núcleo-citoplasma. Generalmente, presentan un solo nucléolo, citoplasma con pocos organelos y algunas mitocondrias de gran tamaño situadas cerca del núcleo o *nuage*. También se hallan los denominados

ciment o cuerpo germinales densos, los cuales son un material denso que está íntimamente ligado a las mitocondrias (Le Menn et al., 2007). Justamente, la presencia de estas inclusiones citoplasmáticas granulares (*nuage*) permiten la identificación de las CGPs con respecto a otros tipos de células (Devlin y Nagahama, 2002).

Una vez formadas las CGPs se mantienen estrechamente asociadas con los tejidos endodérmicos y migran durante el desarrollo embrionario a través del mesenterio dorsal del intestino hacia la región de las gónadas para formar un único primordio gonadal, aunque posteriormente se formaran dos grupos, uno a cada lado de la línea media dorsal de la región dorsal de la cavidad abdominal, que darán lugar a las gónadas. Luego el desarrollo posterior permite las interacciones celulares, que llevan a la diferenciación de los tipos celulares especializados característicos del testículo o del ovario. Finalmente la cresta gonadal se forma como un engrosamiento longitudinal del mesodermo que sobresale en la cavidad abdominal, en posición ventral con respecto al riñón en desarrollo y lateral al mesenterio dorsal (Nakamura et al., 1998; Devlin y Nagahama, 2002; Zanuy et al., 2009).

IMARPE

1.4.2. Diferenciación testicular y espermatogénesis

Los testículos de los teleósteos son órganos alargados, pareados porque comprenden dos lóbulos separados por un tabique o independientes y se encuentran unidos por la pared dorsal de la cavidad corporal. Además están constituidos por dos compartimentos, el lobular que contiene los espermatocistes formados por una sola espermatogonia (primaria) rodeada por una o unas pocas células de Sertoli, cuya función es de mantenimiento de los espermatocitos; y el compartimento intersticial localizado entre los lóbulos, que contiene fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos y las células de Leydig que son de origen somático (García-López et al., 2005; Zanuy et al., 2009). Además, está presente otra estructura que se desarrolla en la parte caudal de cada lóbulo testicular, la cual está formada por células epiteliales que producen parte del fluido seminal. Estas células forman un vaso eferente que se abre dentro de un vaso deferente o

conducto espermático, por el cual los espermatozoides son liberados hacia el exterior (Arellano-López y Sarasquete-Reiriz, 2005).

La espermatogénesis es la producción de espermatozoides (Gilbert, 2006) para ello las células germinales masculinas pasan por tres fases principales: (1) *proliferación mitótica*, (2) *meiosis* y (3) *espermiogénesis*. Durante la primera fase, las espermatogonias madre (tipo A) dentro de un espermatocisto aumentan en número y por mitosis forman varias generaciones de espermatogonias hijas, donde cada generación tiene diferencias morfológicas como el incremento de la heterocromatina y la disminución del tamaño celular y nuclear; a la última generación de estas células se les denomina espermatogonias B, las cuales pasan por la última mitosis y dan origen a los espermatocitos primarios. En la siguiente fase, estos últimos pasan por primera división meiótica y forman los espermatocitos secundarios, los cuales son de vida muy corta, posteriormente, tras la segunda división meiótica forman las espermátidas. Finalmente en la espermiogénesis las espermátidas se diferencian en espermatozoides (Schulz y Miura, 2002; Schulz et al., 2005).

IMARPE

1.4.3. Diferenciación ovárica y ovogénesis

El ovario generalmente es un órgano par, situado ventralmente en la cavidad abdominal. Está formado por el estroma ovárico que es un tejido de soporte compuesto por fibras de colágeno que se halla envuelto por una capa de musculatura lisa, tejido vascular y nervioso. El estroma ovárico es una estructura vascularizada en la cual se encuentra el folículo ovárico, el cual está compuesto por el ovocito y las células foliculares las cuales lo envuelven. Estas células foliculares forman dos capas de células diferenciadas y separadas por una membrana basal; donde la capa interna está formada por células de la granulosa y el ovocito, la externa consiste de las células de la teca (Arellano-López y Sarasquete-Reiriz, 2005).

También existe una cavidad ovárica central libre, la cual, durante las fases tempranas de desarrollo se considera como evidencia histológica para la identificación de la gónada como un ovario (Nakamura et al., 1998). Esta estructura

es la receptora de los ovocitos maduros para que luego sean conducidos hacia el conducto ovárico, que es una prolongación de la túnica del ovario y desemboca al exterior por poro genital (Arellano-López y Sarasquete-Reiriz, 2005).

La ovogénesis es la diferenciación del óvulo y es un proceso homólogo, aunque diferente a la espermatogénesis, sobre todo porque el ovocito desarrolla una serie de complejas transformaciones citológicas. Los mecanismos de la ovogénesis son más variables entre las especies que la espermatogénesis (Gilbert, 2006). La ovogénesis inicia con las divisiones mitóticas sucesivas que van desde las CGP indiferenciadas, que dan lugar a las ovogonias, posteriormente a los ovocitos y finalmente a los óvulos (Zanuy et al., 2009).

Durante la previtelogénesis, los ovocitos primarios comienzan a sintetizar moléculas de diferentes tipos (e.g. RNAs) y su diámetro de incrementa, a lo cual se le denomina ovocito primario *en* fase I. Estas células inician la meiosis y se detiene durante la profase I. Este estadio incluye la fase prefolicular donde los ovocitos se encuentran juntos en un espacio bordeado por una sola capa de células somáticas o prefoliculares y comienza la condensación de cromosomas, característica de la primera etapa de la meiosis. Antes de la entrada a la etapa de diploteno, el ovocito se rodea por una sola capa de células foliculares (fase folicular) y forman el folículo ovárico que constituye la unidad ovárica esencial. Durante esta etapa los cromosomas se descondensan, y el ovocito queda arrestado en el diploteno de la meiosis I. Otra características de esta etapa es el incremento de las estructuras subcelulares, tales como la mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplásmico Además de la acumulación de mRNAs reservas nutricionales y diversos componentes que ayudarán a la reiniciación de la meiosis y que el proceso de maduración se lleve a cabo adecuadamente (Lyman-Gingerich y Pelegri, 2007; Zanuy et al., 2009)

En la fase II del ovocito primario, el núcleo se caracteriza generalmente por la presencia de un gran nucléolo central y numerosos nucléolos pequeños localizados en la periferia. Además las células de la granulosa se multiplican, aparecen vesículas sanguíneas y alvéolos corticales, en el ooplasma. Estas vesículas se

IMARPE

acumularán en la corteza del ovocito y participarán en el proceso de la fertilización (Le Menn et al., 2007; Lyman-Gingerich, J. y Pelegri F., 2007).

En el estadio III o de *vitelogénesis*, el ovocito fagocita la vitelogenina (VTG) producida en el hígado, la digiere y almacena en su citoplasma para utilizarla como fuente de nutrientes y energía para el desarrollo del embrión. También se da un crecimiento importante del ovocito debido a la incorporación de lipoproteínas de muy baja densidad. Después de esta etapa un cambio en la estimulación hormonal permite que el ovocito reanude la meiosis y continúe hacia estadio IV o de la *maduración final del ovocito* (FOM). Este estadio se caracteriza por el movimiento del núcleo del ovocito hacia el polo animal, la reanudación de la meiosis hasta la producción del primer cuerpo polar. El ovocito aumenta en tamaño debido a la proteólisis de proteínas del vitelo y a la hidratación. Finalmente, continúa el estadio V u *ovulación*, que implica la expulsión de los ovocitos del folículo hacia el lumen del ovario, para que posteriormente sea liberado durante el apareamiento (Lyman-Gingerich y Pelegri, 2007; Zanuy et al., 2009).

IMARPE

1.5. Justificación

El lenguado de California es una especie con alto valor comercial debido a la textura y sabor de su carne. El cultivo de esta especie resulta de gran interés gracias a la alta demanda en el mercado por lo que su producción se considera rentable y porque se puede fomentar la recuperación de las poblaciones naturales que han disminuido debido a las pesquerías.

Tanto en el lenguado de California como en otros peces planos las hembras tienen un mayor crecimiento que los machos, por lo cual su cultivo resulta ventajoso. Sin embargo en los cultivos experimentales se ha registrado un mayor porcentaje de machos, incluso hasta un 100%. Con la finalidad de obtener un cultivo monosexo de hembras se puede suministrar E2 en la dieta pero es necesario conocer los procesos de determinación y diferenciación sexual.

Por tal motivo, la presente investigación brindará información importante sobre la gonadogénesis así como la concentración del E2 y 11-KT durante la diferenciación con la finalidad de precisar el periodo lábil para la diferenciación sexual del lenguado de California *Paralichthys californicus*. Asimismo, proporcionará información sobre el control del sexo mediante el suministro de E2 a través de la dieta (nauplios de *Artemia* y alimento formulado), para incrementar la proporción de hembras en la progenie.

IMARPE

1.6. Hipótesis

- El incremento de la concentración natural de la hormona 17β-estradiol durante el periodo lábil induce la diferenciación sexual hacia hembras en las larvas del lenguado de California.

- El suministro de alimento vivo y formulado enriquecido con diferentes concentraciones de la hormona 17β–estradiol durante la ontogénesis gonadal del lenguado de California, incrementa la proporción de hembras en la progenie.

IMARPE

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual del lenguado de California *Paralichthys californicus* y controlar la proporción de sexos mediante la aplicación de la hormona 17β-estradiol.

1.7.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo de enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con la hormona 17β-estradiol.
- Complementar la descripción del desarrollo gonadal mediante el análisis histológico de las gónadas.
- Identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual por medio de la evaluación de la dinámica de la concentración de la hormona 17β-estradiol y 11-cetosterona durante el desarrollo larval.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de hormona 17β-estradiol suministrada a través del alimento, sobre la proporción de sexos.

IMARPE

2. Materiales y métodos

El bioensayo se realizó en el Laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura del CICESE en Ensenada, Baja California.

2.1. Protocolo de cultivo para el experimento

Los huevos de lenguado se obtuvieron de un desove espontáneo de reproductores de lenguado del Laboratorio de Peces Marinos y se mantuvieron en dos incubadoras de 2000 l, provistas de un sistema de recirculación independiente y con aireación constante. Los parámetros de cultivo fueron los siguientes: temperatura de 20.3 ± 0.3°C, salinidad 36 ups, oxígeno disuelto 6.6 ± 0.2 mg/l. El cultivo de las larvas se hizo de acuerdo al protocolo de cultivo del laboratorio. Brevemente, la alimentación de las larvas se inició a partir del segundo día después de la eclosión (DDE). Las larvas se alimentaron con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) a una concentración de 5 rotíferos/ml hasta los 20 DDE. Entre los 21 y 24 DDE las larvas fueron coalimentadas con nauplios de *Artemia* (Artemia International, Grade AA) recién eclosionados y enriquecidos con una emulsión rica en ácidos grasos poliinsaturados (Algamac 3000, Aquafauna Bio-Marine). El suministro de rotíferos fue disminuyendo paulatinamente en una proporción de 75, 50, 25 y 0% durante dicho periodo. Después de los 25 DDE y hasta el día 40 DDE, las larvas fueron alimentadas únicamente con nauplios de *Artemia* enriquecidos, manteniéndose una densidad de 5 nauplios /ml.

El destete se realizó durante un periodo de 10 días, donde se suministró simultáneamente *Artemia* y la dieta formulada microparticulada (Otohime, Reed Mariculture, Campbell, CA). A partir del día 50 DDE sólo se proporcionó la dieta formulada teniendo en cuenta el tamaño de la partícula de acuerdo al crecimiento de los organismos. El tamaño de la primera dieta formulada Otohime B1 fue de 250 a 360 µm seguida del C1 con partículas de 580 a 840 µm. Finalmente a partir del 110 DEE se alimentaron Otohime EP2 (2.3 mm). Los organismos fueron alimentados con dos raciones a saciedad hasta el final del experimento (180DDE).

IMARPE

Para el desarrollo del experimento, a los 20 DDE se sembraron 2800 larvas por unidad experimental, en un sistema de recirculación de 18 tanques circulares de fibra de vidrio de 275 l capacidad (diámetro 0.76 m y altura 0.6 m), de color azul claro y fondo negro, con temperatura controlada y fotoperiodo natural. El volumen de agua utilizado en cada unidad experimental fue de 50 l y se colocaron piedras difusoras para mantener la concentración adecuada de oxígeno disuelto y permitir una distribución homogénea del alimento y la temperatura en todo el tanque. A partir del día 60 DDE el sistema fue abierto a la circulación, con la finalidad de evitar una contaminación cruzada, por el efecto de la lixiviación de la hormona contenida en el alimento formulado.

Diariamente se registraron la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto de las unidades experimentales, usando un medidor digital (YSI, modelo 85). La concentración de amoniaco, nitritos y nitratos se cuantificó cada tercer día con un kit colorimétrico comercial (API, Canadá).

Para evaluar el crecimiento durante el periodo experimental se tomaron muestras de 15 organismos cada 10 días desde el día 21 DDE hasta el 55 DDE y 10 organismos del 65 DDE hasta el 115 DDE. Se midió la longitud total de las larvas utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus) equipado con una rejilla micrométrica, mientras que los juveniles con un vernier (FST). La longitud total de los tratamientos se comparó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de confianza del 95%.

IMARPE

2.2. Bioensayo para el control de la proporción sexual

El bioensayo para evaluar el efecto de la concentración de estradiol en el alimento sobre la proporción sexual, consistió en un control (en cual las larvas no fueron expuestas al estradiol) y tres tratamientos donde las larvas fueron alimentadas con una dieta enriquecida con 2.5, 5 y 10 mg/kg de 17-β estradiol (E2, Sigma-Aldrich Co.), tratamientos T1, T2 y T3 respectivamente. A partir de los 25 DDE se alimentaron con metanauplios de *Artemia* y después del día 50 y hasta el día 180 con alimento formulado, ambos enriquecidos con las concentraciones

experimentales de E2. Tanto el control como los tratamientos constaron de 4 repeticiones cada uno.

2.2.1. Enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con 17β-estradiol

Para obtener los nauplios, en primer lugar se llevó a cabo la decapsulación de los quistes de *Artemia*, para ello se hidrataron en agua dulce por 1 h. Luego se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 50 % por 2.5 min y se enjuagaron con agua dulce durante 5 min. Posteriormente se sembraron los quistes en un tanque cónico con 150 l de agua a una salinidad de 25 ups, temperatura de 25ºC y con aireación constante

Para el enriquecimiento, de los nauplios de *Artemia* con ácidos grasos esenciales y E2, después de 24 horas de incubación de los quistes, los nauplios eclosionados se cosecharon y se sembraron en estanques cilíndricos de 45 l a una densidad de 100 000 nauplios/l. El enriquecedor se preparó emulsificando 0.2 g/l de Algamac 3000 (Biomarine, INC) y la cantidad necesaria de una solución de E2 en agua con una salinidad de 25 ups, mediante la agitación vigorosa con una licuadora doméstica por 1 min. La solución concentrada de E2 se preparó a una concentración de 5 mg/ml en alcohol al 70%.

IMARPE

El periodo de enriquecimiento fue de 15 h, los nauplios se cosecharon y lavaron. Luego se repartió este alimento en dos raciones, la primera se suministró inmediatamente y la segunda se almacenó a 4ºC por 8 h antes de suministrarla a los nauplios. Para el caso del control, se procedió el enriquecimiento de los nauplios de forma similar, exceptuando la adición de la hormona en el enriquecedor.

Adicionalmente, se cuantificó el peso seco de la *Artemia*, para ello se prepararon 10 crisoles de aluminio y se incineraron en una mufla a 490ºC por 2 h. Luego se pesaron los crisoles en una balanza analítica (Mettler, modelo AE 240) y a cada uno se le colocó un volumen de nauplios de *Artemia* equivalente a 100 nauplios los cuales se tamizaron y enjuagaron con formiato de amonio al 3%. Las muestras se

colocaron a 70ºC por 24 h en una estufa y se cuantificó el peso seco de las muestras.

2.2.2. Enriquecimiento del alimento formulado con la hormona 17β-estradiol

Para enriquecer el alimento con las diferentes concentraciones de E2, se preparó una solución concentrada de la hormona a una concentración de 0.7 mg/ml disuelta en alcohol etílico al 70%. Por cada 100 g de alimento formulado, se disolvió el volumen necesario de esta solución en 30 ml de alcohol al 70% para obtener las concentraciones finales de los tratamientos. Para distribuir en forma homogénea la solución con el esteroide, el alimento se colocó en un vaso de precipitado y se mezcló vigorosamente con un agitador tipo vórtex (VWR Digital Mini Vortexer, modelo 945303) y con la ayuda de una bureta, la solución alcohólica de E2 se agregó lentamente por goteo.

Una vez mezclado el alimento, se dejó secar a una temperatura de 40ºC durante 2 horas. Después, se almacenó en envases cerrados y oscuros a 4ºC. Para el caso del alimento control se procedió de forma similar exceptuando la adición de la hormona.

IMARPE

2.2.3. Verificación de la concentración de la hormona en el alimento

Para cuantificar la concentración de la hormona en los nauplios de *Artemia*, al terminar el periodo de enriquecimiento, se tomó una muestra de 5 ml de la solución enriquecedora con nauplios de cada tratamiento, los nauplios se concentraron en un tamiz y se lavaron profusamente con agua de mar, se eliminó el excedente de agua y se colocó cada muestra en un tubo de ensayo de 6 ml. A cada tubo se le agregó 1 ml de diclorometano (Sigma-Aldrich Co.) y se homogenizó con una varilla de vidrio.

Para la cuantificación de la hormona en el alimento formulado, se pulverizó una muestra de cada concentración y del control con un molino analítico (IKA, modelo A11BS1), se pesó 0.5 g y se colocó en un tubo de ensayo, se adicionó 1 ml del

solvente y se agitó vigorosamente. La extracción de esteroides se realizó dos veces y todo el proceso se realizó en una campana de extracción.

Los homogenizados se centrifugaron a 112 rcf (Centrífuga Heraeus Megacentrifuge 16R Thermo Scientific), a 10ºC por 30 min y el sobrenadante se transfirió a un tubos limpios. El solvente se evaporó colocando los tubos en un baño María a 30ºC y bajo una corriente suave de nitrógeno y posteriormente, los tubos con el extracto se almacenaron a -80ºC para su posterior análisis. Solo en caso del alimento formulado se filtró la muestra con un papel filtro (Ahlstrom) previo a la evaporación.

Para cuantificar la concentración de la hormona, se utilizó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas *(ELISA)* utilizando un kit comercial para 17β-estradiol (Cayman Chemical Company) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Se preparó una curva patrón con las siguientes concentraciones: 6.6, 16.4, 41.0, 102.4, 256, 640, 1600 y 4000 pg/ml de estándar de estradiol. Para cuantificar el estradiol de las muestras de alimento, los extractos se resuspendieron en 0.5 ml del amortiguador EIA. El kit cuenta con una placa de 96 pocillos donde se colocaron los blancos, la curva patrón y las muestras, se les agregó un trazador de estradiol y un antisuero, se enjuagó la placa con un amortiguador de lavado y se adicionó el revelador. Se incubó por 90 min con agitación constante y protegido de la luz. Finalmente, se leyó la placa con un espectrofotómetro (Beckman Coulter, modelo TM AD200) a 405 nm. Con los datos de la absorbancia y mediante la utilización de ecuaciones que relacionan la concentración con la absorbancia, se cuantificó la cantidad de estradiol en las muestras.

IMARPE

2.3. Descripción de la génesis gonadal e identificación del sexo

Para la descripción del desarrollo gonadal se realizaron muestreos de 5 organismos cada 10 días de los 25 a los 55 DDE y 3 de organismos entre los 65 DDE y 115 DDE. Para referir los eventos del desarrollo gonadal a las etapas de desarrollo general se tomó como base la clasificación del crecimiento propuesta por Gisbert et al. (2002) para el lenguado de California. Además para el reconocimiento de las diferentes estructuras de la formación de la gónada se tomó como

referencia la investigación realizada por Luckenbach et al. (2003) en el lenguado del sur *Paralichthys lethostigma*.

Las larvas se fijaron en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957) (Apéndice 1) en un volumen de 1:5 por al menos 7 días. Cuando la longitud total de las larvas fue menor a 60 mm, se procesaron *in toto*, los ejemplares de una longitud mayor o igual a 60 mm fueron descalcificados en una solución de Acido fórmico-Formalina (Bancroft y Gamble, 2002) por 7 días. A continuación, las larvas se colocaron individualmente en casetes histológicos y fueron deshidratadas en un procesador automático de tejidos (Leica, modelo TP1020) (Apéndice 2). Finalmente se incluyeron en parafina mediante un centro de inclusión de tejidos (Leica, modelo EG 1160).

Se hicieron cortes histológicos de un grosor de 5 a 6 micras utilizando un micrótomo rotatorio (American Optical, modelo Spencer 820), se recuperaron en portaobjetos, se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina/Floxina (Shaw y Battle, 1957) (Apéndice 3) y se montaron con resina (Cytoseal 60 Thermo Scientific)

IMAPPE

Para le identificación del sexo y la cuantificación de la proporción sexual, al final del bioensayo se colectaron 40 larvas por tratamiento (10 por estanque), se sacrificaron con una sobredosis (10 gotas por 1L) de aceite de clavo (Sigma-Aldrich Co.) y se fijaron en solución Davidson por al menos 7 días, luego, se disecaron las gónadas y se procesaron siguiendo el procedimiento histológico descrito anteriormente. Finalmente se calculó la proporción de sexos por cada tratamiento y se analizaron mediante la prueba de X^2.

Para evaluar el efecto de la hormona sobre el desarrollo gonadal, se observó si existían alteraciones histológicas de la estructura gonadal, como hipertrofia o hiperplasia. De la misma forma, se cuantificó la proporción de ovocitos en sus diferentes estadios de desarrollo (ovogonias, ovocitos primarios en fase I y fase II) en 9 individuos de cada tratamiento mediante una prueba de X^2.

Para la descripción histológica de la gametogénesis e identificación del sexo, las láminas histológicas se analizaron con la ayuda de un microscopio compuesto (Olympus CX31) equipado con una cámara Olympus (C-5060) de 5.1 megapíxeles, las fotografías se tomaron con una resolución de 2592 x 1944. También se utilizó un microscopio invertido (Life Technologies EVOS XL) con cámara incorporada de 3.1 megapíxeles y las fotografías se tomaron con una resolución de 2048 x 1536.

2.4. Identificación del periodo lábil para la diferenciación sexual

Para la identificación del periodo lábil se cuantificaron las concentraciones de la hormona E2 y 11-KT, para ello se tomaron muestras de 10 organismos cada 10 días desde los 2 a los 55 DDE y 6 organismos de los 65 a los 115 DDE.

La extracción de las E2 se hizo homogeneizando grupos de 5 larvas con 1 ml de diclorometano (SIGMA 650463) en tubos de ensayo, para las larvas de 75 DDE se utilizó una varilla de vidrio y para larvas mayores a esa edad se utilizó un homogeneizador portátil (POLYTRON®, modelo PT 1200). La extracción continuó de acuerdo con el procedimiento descrito para los nauplios de *Artemia*.

La extracción de 11-KT se hizo de forma similar, pero el solvente utilizado fue dietiléter (Sigma-Aldrich Co.). Posteriormente se utilizó un kit comercial para 17β-estradiol y 11-cetotestosterona (Cayman Chemical Company) y la cuantificación se hizo de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

IMARPE

3. Resultados

3.1. Cultivo de larvas y juveniles de lenguado

La variación registrada en las características fisicoquímicas de las unidades experimentales fue mínima debido a que tuvieron las mismas condiciones de cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Características fisicoquímicas del medio de cultivo de lenguado de California *Paralichthys californicus*. Valores: media ± desviación estándar.

Tratamiento	Temperatura (ºC)	Oxígeno Disuelto (mg/l)
Control (0 mg/kg)	19.0 ± 0.9	6.91 ± 0.44
T1 (2.5 mg/kg)	18.9 ± 0.9	6.88 ± 0.30
T2 (5 mg/kg)	19.0 ± 0.9	6.88 ± 0.27
T3 (10 mg/kg)	19.1 ± 1.0	6.93 ± 0.24

IMARPE

La temperatura del agua se controló con una bomba de calor de 1/2 HP (Delta Star, modelo DSHP-5-WC). Las temperaturas mínima y máxima para el sistema fueron de 16.7 y 21.7ºC respectivamente. La temperatura es un factor determinante en el proceso de diferenciación sexual, por lo cual se realizó un análisis de varianza para los valores de temperaturas de los diferentes tratamientos y no se observaron diferencias ($F=0.64$, $p>0.05$).

Durante el desarrollo del bioensayo, se hicieron biometrías a los 25, 35, 45, 65, 75, 85, 95 y 115 DDE en todos los tratamientos, con el fin de evaluar algún efecto del esteroide en el crecimiento (Figura 3). Se observó que durante el periodo de muestreo hay una superposición en las curvas de crecimiento del control y los tratamientos, debido a la gran dispersión de tallas dentro de los estanques.

Al comparar las longitudes alcanzadas a los 115 DDE entre los lenguados expuestos a los tratamientos de E2, incluido el control, no se encontraron diferencias significativas (F=0.58, p>0.05), por lo que el E2 no afectó el crecimiento (Figura 4).

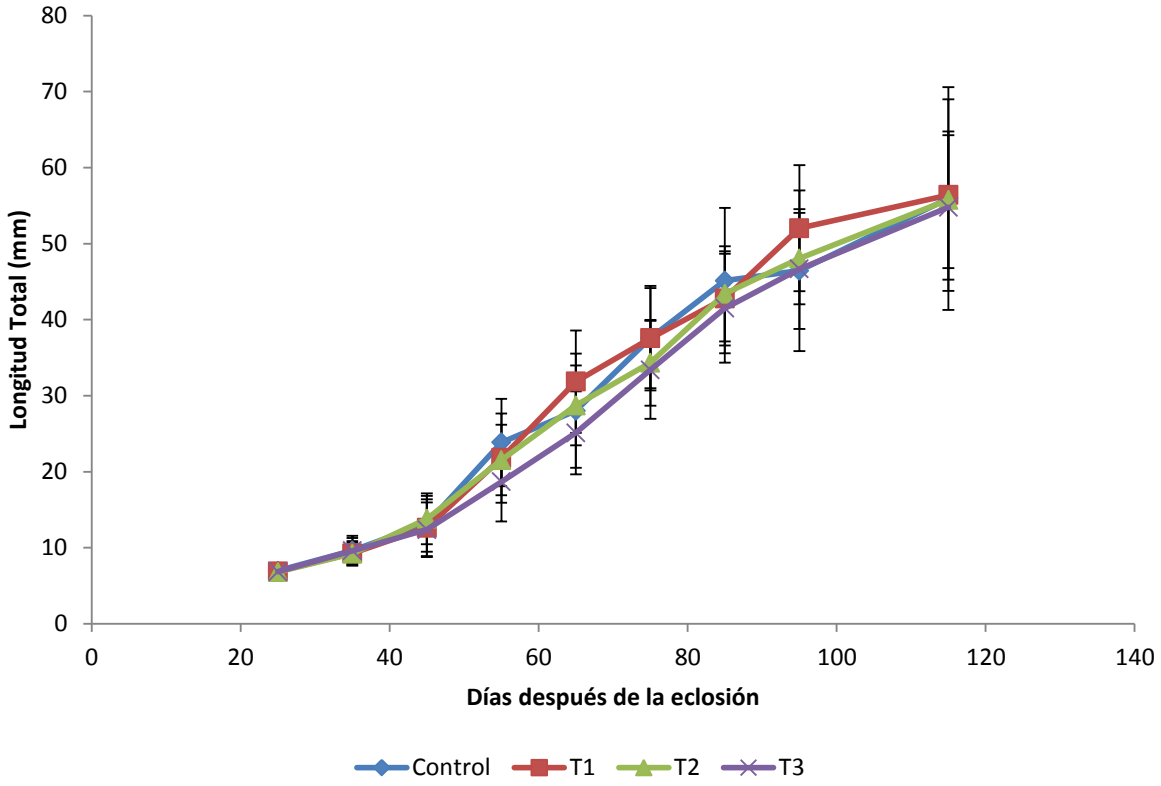
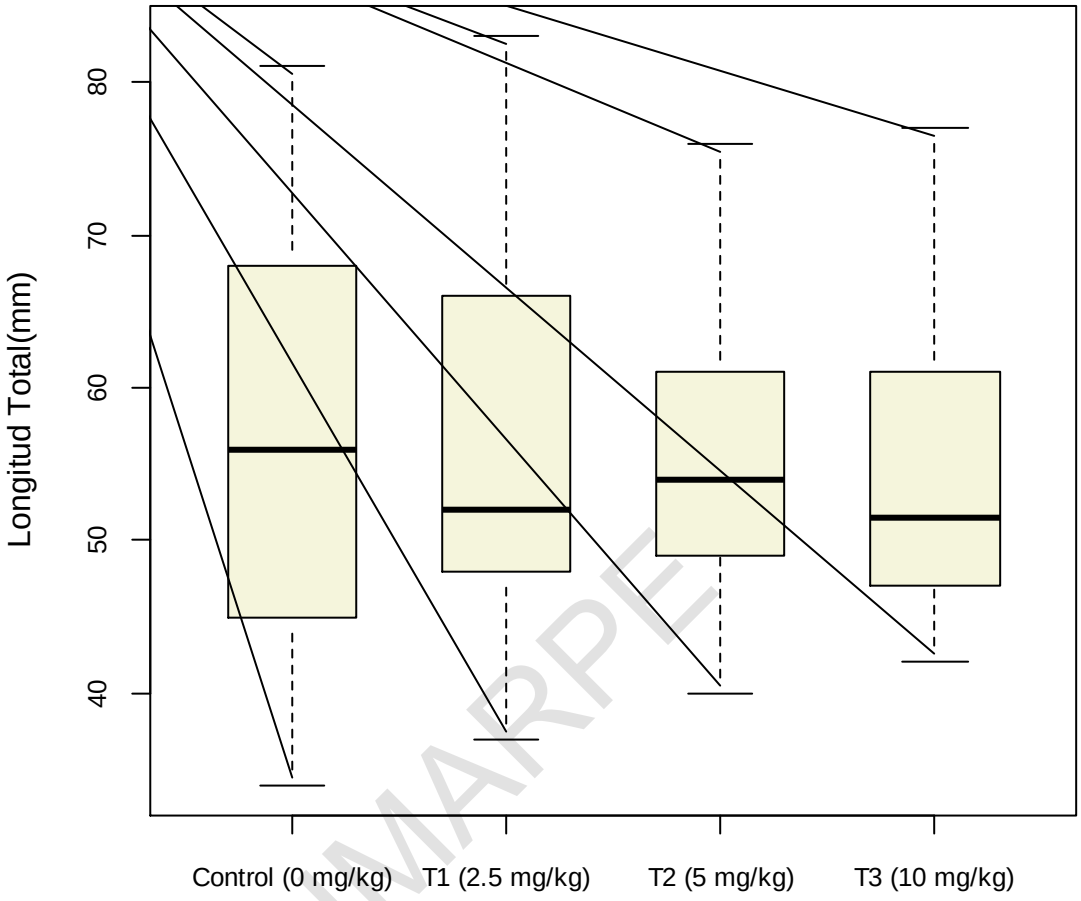


Figura 3. Crecimiento expresado como longitud total promedio de lenguado de California *Paralichthys californicus* tratado con cuatro concentraciones de 17-β estradiol, 0 (control), 2.5 (T1), 5 (T2) y 10 (T3) mg/kg de alimento, de los 25 a los 115 DDE. Las líneas verticales expresan la desviación estándar.



IMARPE

Figura 4. Efecto del 17-β estradiol suministrado a través de la dieta sobre la longitud total del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 115 DDE. (F= 0.58, p>0.05).

Se registró un padecimiento patológico evidenciado por la presencia de lesiones en piel (Figura 5) debido a una infección bacteriana lo que afectó la salud de los organismos causando mortalidades en los estanques a partir del 115 DDE. Es probable que la infección ocasionara una sepsis generalizada causando la muerte de algunos organismos. Con la finalidad de controlar la proliferación bacteriana, se aplicaron baños de oxitetraciclina (Terramicina, Pfizer), a una concentración de 40 mg/l por una hora, el tratamiento se repitió diariamente durante cuatro días.

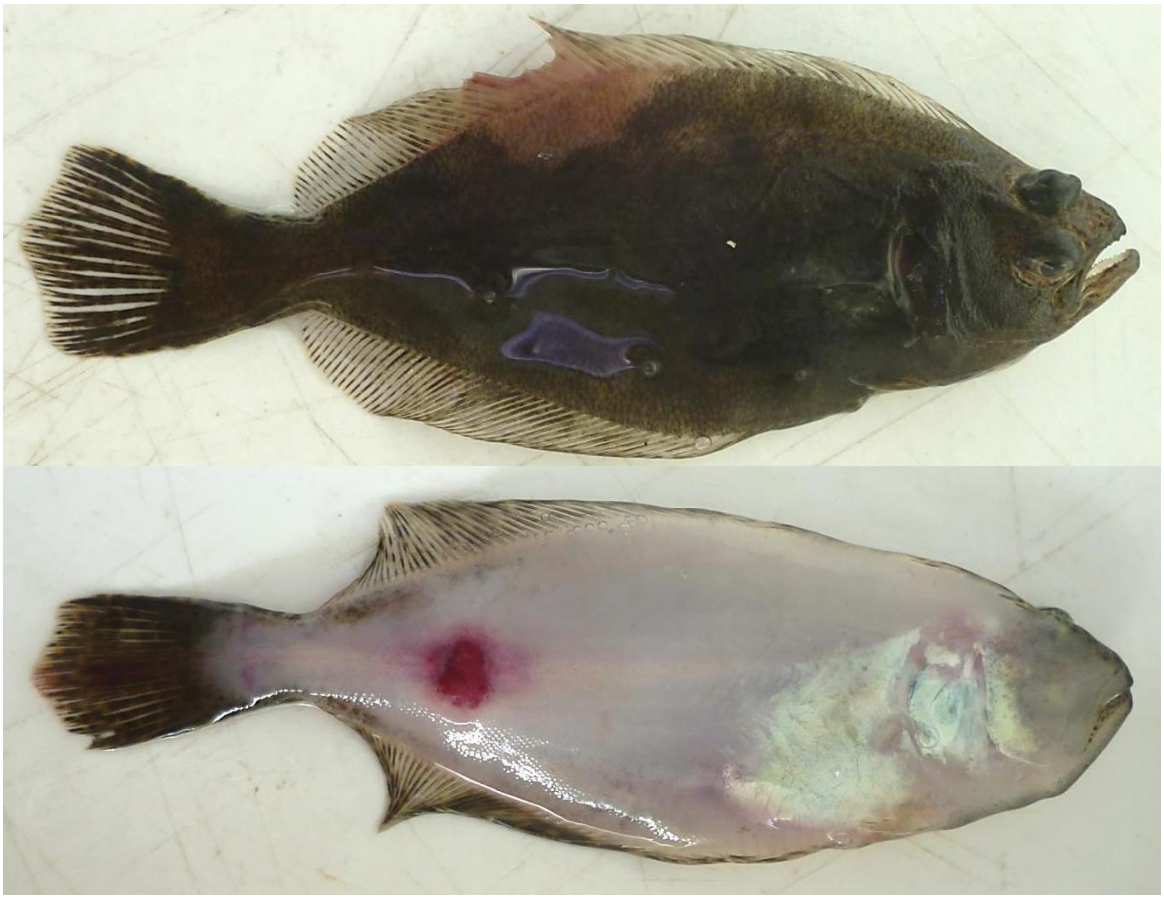


Figura 5. Juveniles de lenguado de California, *Paralichthys californicus* de 125 DDE con lesiones en la piel.

3.2. Descripción de la génesis gonadal

Para describir la génesis gonadal, se procesaron histológicamente muestras de organismos entre los 25 y 180 DDE. Los días 25, 35, 45 y 55 se tomaron muestras de 5 organismos de cada estanque (N=20 por tratamiento), los días 65, 75 y 115 DDE se tomaron muestras de 3 organismos de cada estanque (N=12 por tratamiento) y a los 180 DDE al menos se tomaron 8 organismos por estanque (N>32 por tratamiento) ya que también se evaluó la proporción sexual.

La identificación de la gónada sobre todo en las primeras etapas de desarrollo fue un proceso complicado, para el cual se requirió realizar numerosos cortes histológicos de cada una de las muestras debido al tamaño de dicha estructura y a la singularidad de su posición. La gónada de las larvas se ubica en posición ventral, en la región posterior de la cavidad abdominal (Figura 6).

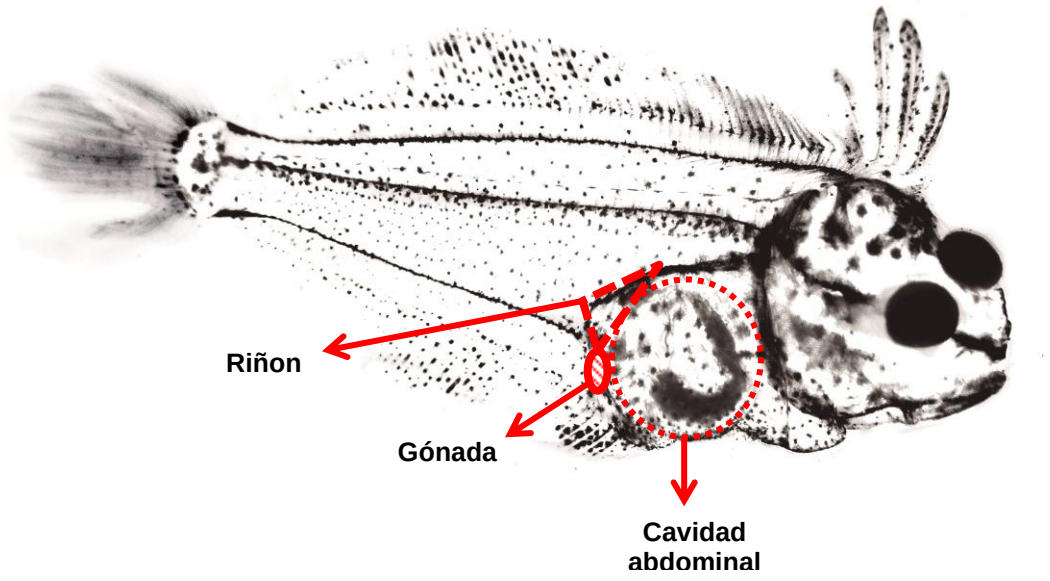


Figura 6. Ubicación de la gónada con respecto a la cavidad abdominal en una larva de lenguado de California *Paralichthys californicus* de 25 DDE.

3.2.1. Edad 25 DDE (Longitud total promedio de 6.96 ± 0.92 mm)

A los 25 DDE las larvas se encontraban entre el estadio E o de preflexión (larvas en las etapas intermedias de la flexión de la notocorda, con un ángulo de 45º con respecto al eje principal del cuerpo) y el estadio G o de postflexión (se caracteriza por la reducción de los radios de la cabeza y el inicio del proceso de migración de los ojos (Gisbert et al., 2002).

Durante el periodo inicial del desarrollo gonadal, que se identifica por la presencia del primordio gonadal debajo de la línea media (plano sagital) en posición ventral y posterior a la cavidad abdominal entre el riñón y el intestino (Figura 7A). El primordio gonádico se identificó por la presencia de una CGP, que se caracteriza por su forma ovalada, diámetro de 8 -10 µm, poco citoplasma, un núcleo de gran tamaño con un nucléolo prominente y se encuentra rodeada por células mesenquimáticas que se originan de la pared del peritoneo (Figura 7B).

IMARPE

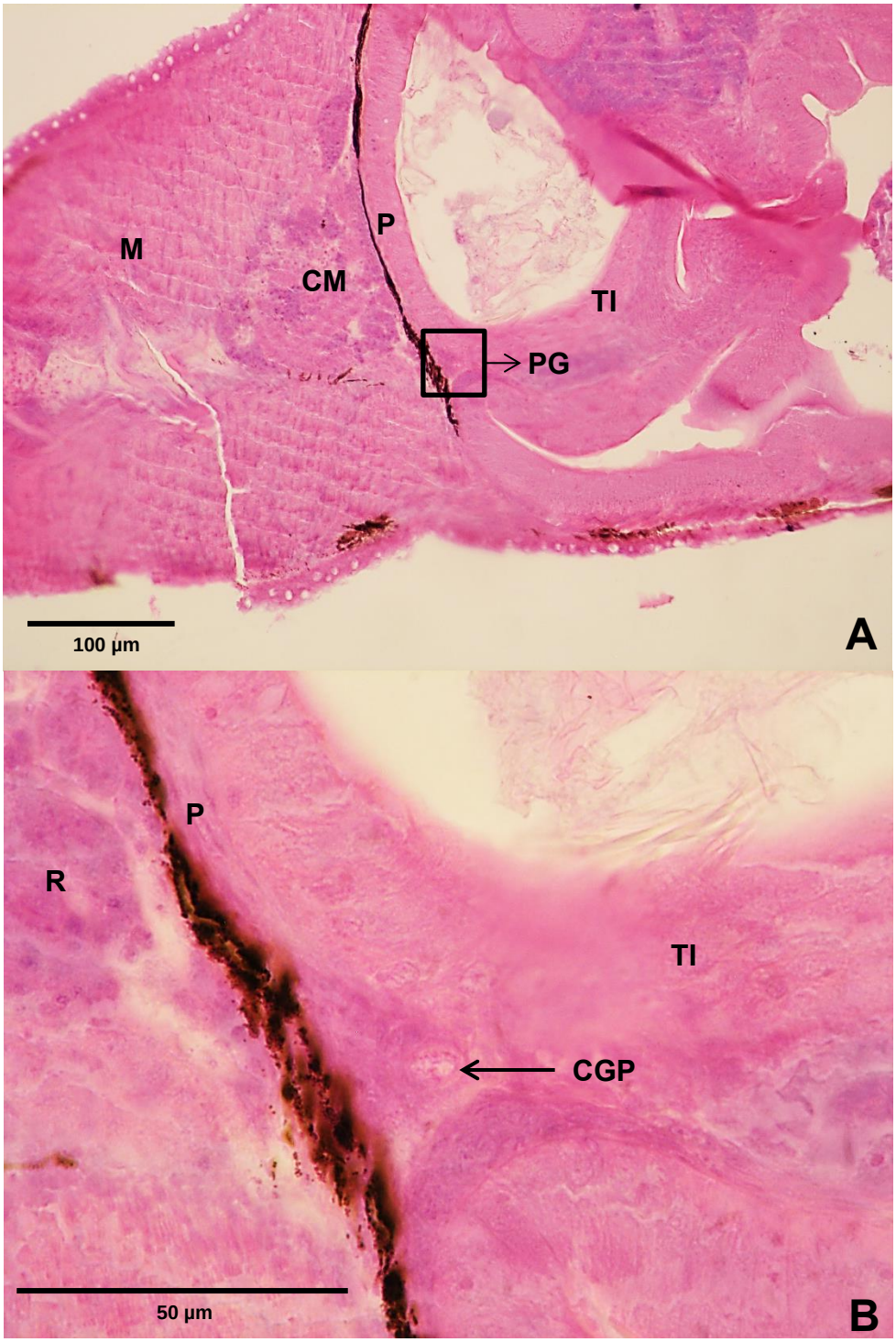


Figura 7. A, Corte histológico de la región abdominal del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 25 DDE. B, Primordio gonadal ubicado en posición adyacente al peritoneo, al intestino y cercano a la región final del riñón. CGP: célula germinal primordial, R: riñón, E: estómago, M: músculo, PG: primordio gonadal, P: peritoneo y TI: Tejido intestinal.

3.2.2. Edad 35 DDE (Longitud total promedio de 9.64 ± 1.95 mm)

A los 35 DDE las larvas se encontraban entre la etapa G o de postflexión y la etapa I, en la cual los organismos se consideran juveniles tempranos, ya que se ha completado el proceso de metamorfosis y poseen características similares a los adultos (Gisbert et al., 2002).

Durante estas etapas la gónada aún se encuentra indiferenciada sin embargo, ha aumentado de tamaño y el número de CGP también se ha incrementado con respecto a la etapa anterior, observándose 3 CGP por sección (Figura 8), sus características son similares a la etapa anterior.

IMARPE

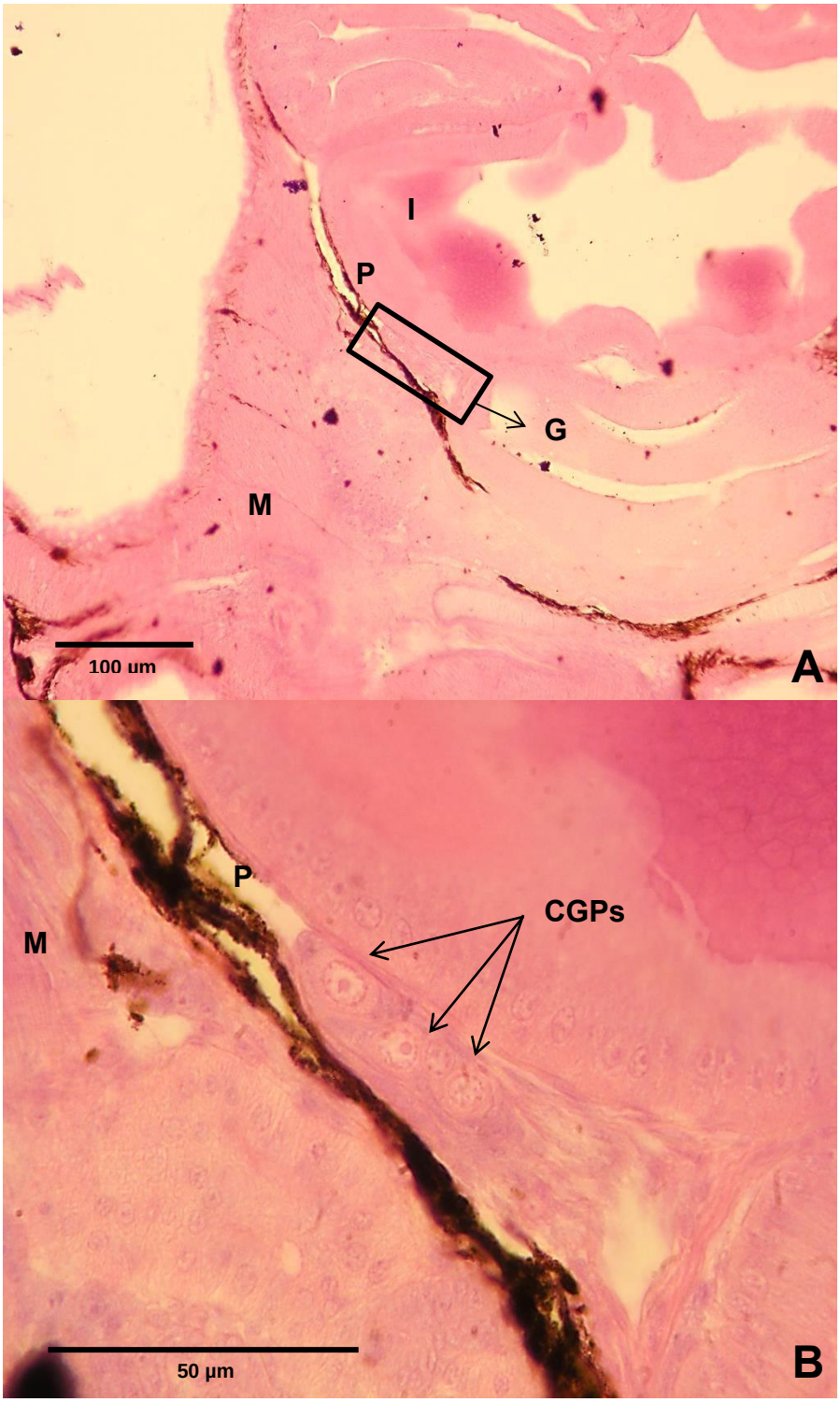


Figura 8. A, Corte histológico de la región abdominal del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 35 DDE. B, Primordio gonadal ubicado entre el riñón y el intestino. CGP: célula germinal primordial, G: gónada, I: intestino M: músculo y P: peritoneo.

3.2.3. Edad 75 DDE (Longitud total promedio de 37.58 ± 6.58 mm)

En las gónadas de ejemplares de 45 DDE (longitud total promedio de 13.16 ± 3.68 mm), 55 DDE (longitud total promedio de 23.84 ± 5.76 mm) y 65 DDE (longitud total promedio de 28.02 ± 7.52 mm) no se evidenciaron cambios sustanciales en su desarrollo, las gónadas se encontraban indiferenciadas y se observaban muy pocas CGP.

A los 75 DDE, la gónada se observa como una estructura más grande de forma alargada por lo cual ha habido un crecimiento longitudinal y se ha incrementado por mitosis el número de CGP. También se evidencia abundante tejido conectivo así como células epiteliales de revestimiento (Figura 9).

IMARPE

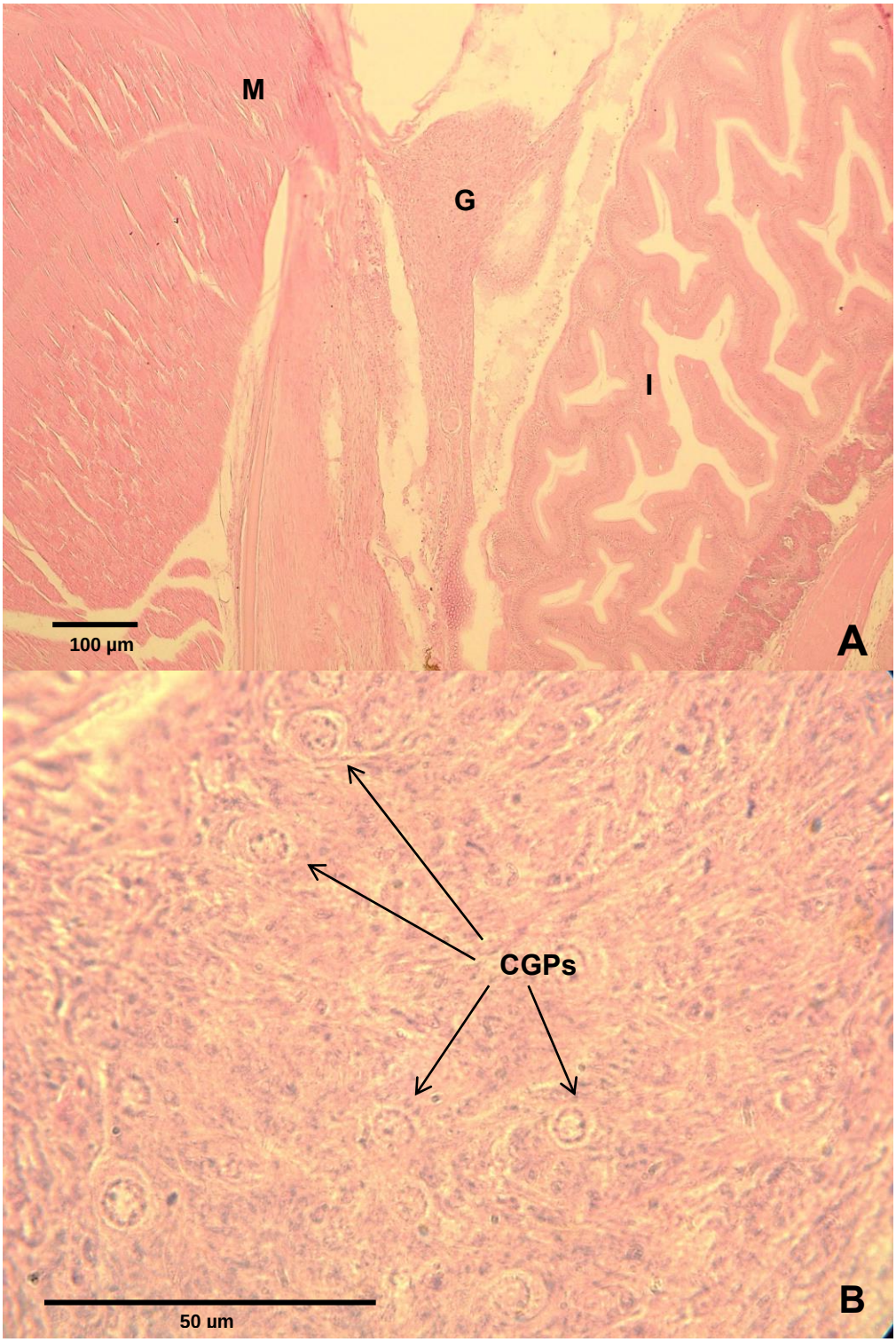


Figura 9. A, Corte histológico de la región abdominal del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 75 DDE. B, Gónada colonizada por células germinales primordiales. I: intestino, M: músculo, G: gónada y CGP: células germinales primordiales.

3.2.4. Edad 115 DDE (Longitud total promedio de 55.93 ± 14.67 mm)

Aquí se registra la primera evidencia de diferenciación sexual, ya que se identifica el ovario por la presencia de la cavidad ovárica, que se observa claramente por la formación de espacios libres de células, ubicados en la parte central de la gónada (Figura 10A). En este periodo las CGPs se han diferenciado en ovogonias, las cuales poseen un gran núcleo ovoide situado en el centro y un nucléolo esférico prominente que el cual tiene una estructura central fibrilar. Asimismo, los contornos celulares y nucleares en las ovogonias se vuelven regulares.

Las ovogonias se ubican hacia los bordes de la cavidad ovárica y también se pueden observar en el estroma gonadal células somáticas, las cuales son células pregranulares que posteriormente se van a unir alrededor del ovogonio. El tamaño de las ovogonias varió entre 8 y 12 µm de diámetro, estas células han migrado a los bordes de la cavidad de ovario y se identifican por la presencia de un gran núcleo ovoide en posición central (Figura 10B). Las ovogonias se dividen por mitosis y posteriormente entran a la primera meiosis por lo que se denominan ovocitos primarios.

Por otro lado, no se observaron gónadas diferenciadas como testículos, por lo tanto, es posible que el proceso de diferenciación de los machos sea posterior al de las hembras. En el caso de los machos no hay cavidad ovárica y posiblemente el arreglo de las CGP difiera de las hembras en que no se agrupan en los bordes del epitelio que circunda a la cavidad ovárica como en la figura 8B, sino que las CGP se agrupen en lóbulos para formar los espermatocistos.

IMAPPE

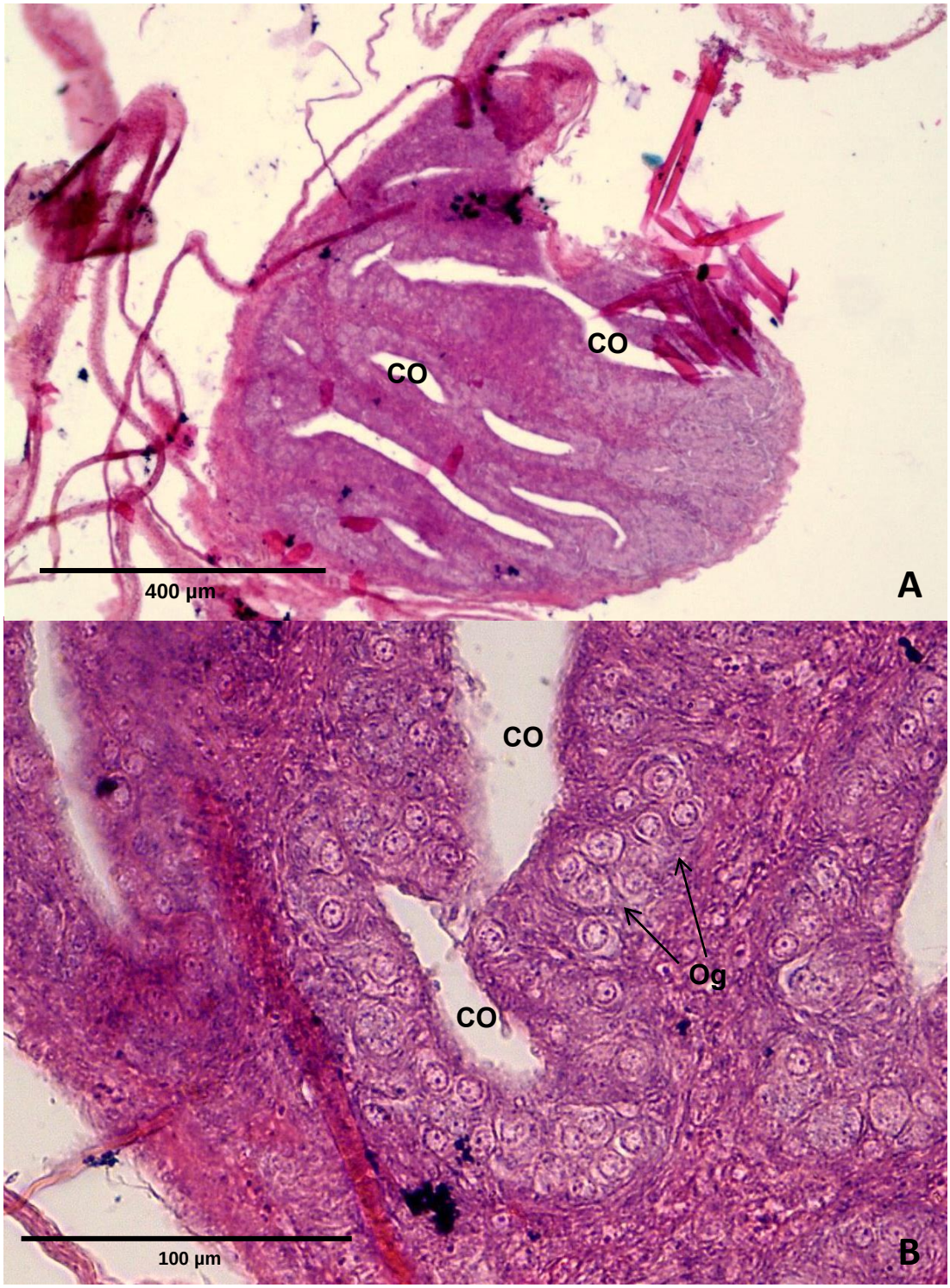


Figura 10. A, Corte histológico del ovario del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 115 DDE. B, Detalle de la cavidad ovárica. CO: cavidad ovárica y Og: ovogonias

3.2.5. Edad 180 DDE (Longitud total promedio de 115.70 ± 17.02 mm)

Las gónadas de los lenguados juveniles de 180 DDE se identificaron como dos órganos de forma de triangular, ubicados ventralmente en el extremo posterior de la cavidad abdominal y en posición posterior con respecto al riñón, cabe aclarar que las gónadas se encuentran en el lado interior de la cavidad abdominal íntimamente asociados al peritoneo, en tanto que el riñón se ubica en posición retroperitoneal (Figura 11). La identificación de las gónadas permitió que se disecaran para procesarlas histológicamente y posteriormente identificar el sexo.

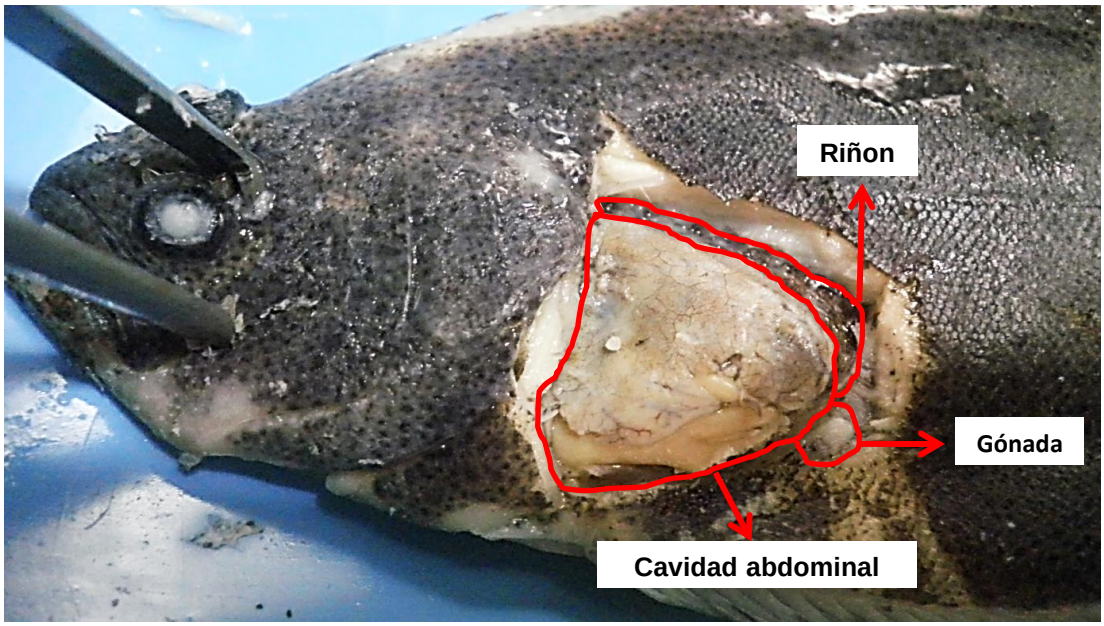


Figura 11. Ubicación de la gónada del lenguado de California *P. Californicus*, en la cavidad abdominal, se indica su posición posterior con respecto al extremo distal del riñón. La imagen corresponde a un lenguado de 180 DDE preservado en solución fijadora.

En este periodo los organismos se encontraron diferenciados sexualmente en hembras y machos. En las hembras, el ovario se identificó por la presencia de la cavidad ovárica, se observa de forma más claro y definida las lamelas ovígeras, que son proyecciones perpendiculares de epitelio dentro de las cuales se encuentran las ovogonias, así como la presencia de células más diferenciadas, los ovocitos, células precursoras de las células tecales y tejido conectivo (Figura 12A).

Los ovocitos primarios se encuentran en la fase I, con un diámetro entre 10 y 13 µm, y están rodeados por las células precursoras de las células de la granulosa para posteriormente formar los folículos definitivos. También se pueden observar ovocitos primarios en fase II, los ovocitos se caracterizan por su gran tamaño con un diámetro que varía entre 14 a 22 µm, la presencia de un citoplasma periférico basófilo, con un núcleo redondo, con un nucléolo grande y varios nucléolos ubicados cerca de la membrana nuclear y cuya función está relacionada con la producción ribosomal, en preparación para las fases posteriores de crecimiento celular o vitelogénesis (Figura 12B).

IMARPE

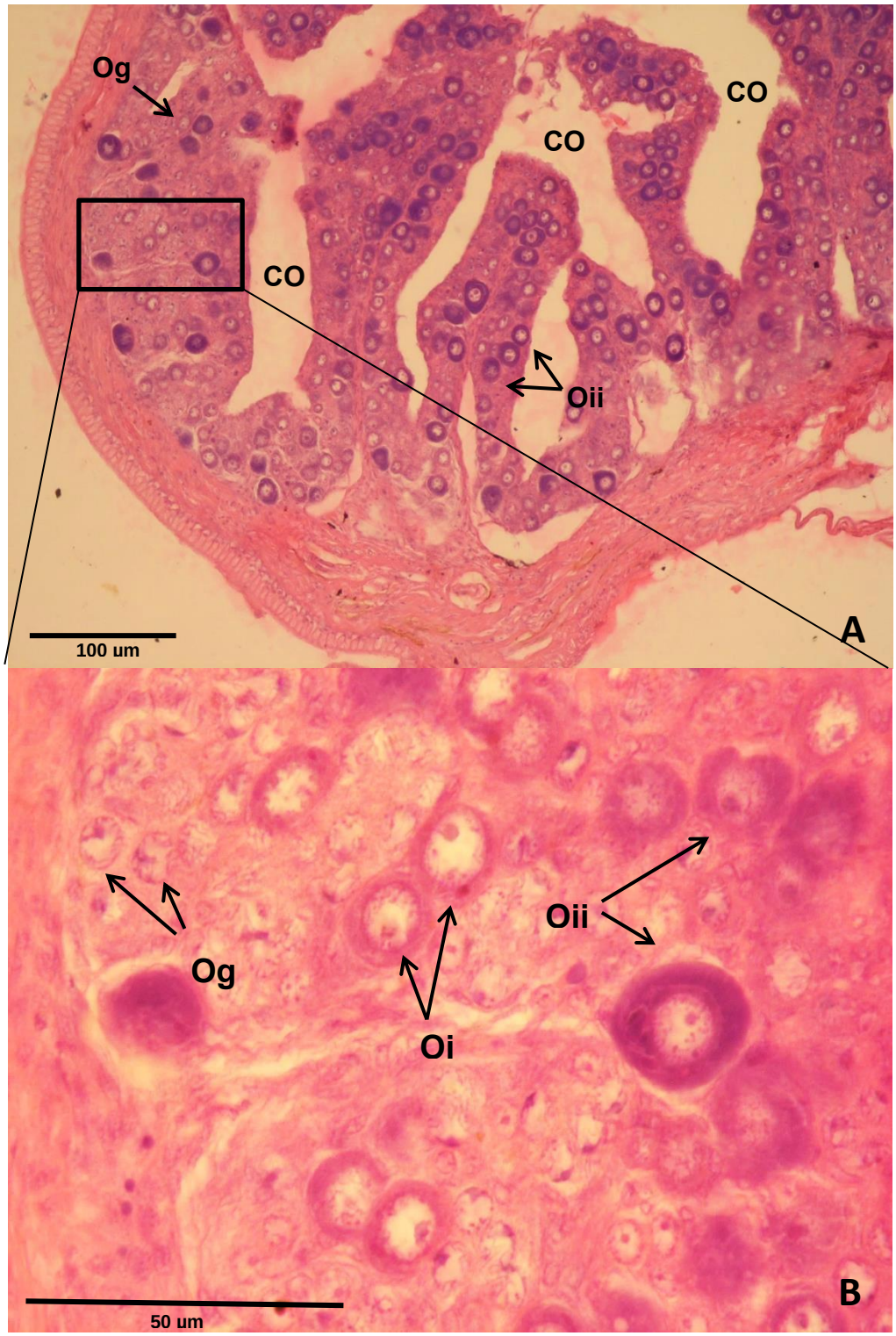


Figura 12. A, Corte histológico del ovario del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 180 DDE. B, Detalle del ovario. CO: cavidad ovárica, Og: ovogonias, Oi: ovocitos primarios en fase I, Oii: ovocitos primarios en fase II.

En los machos, el testículo se identificó por la presencia de las espematogonias, espermatocitos y espermátidas, lo cual indica el inicio de la espermatogénesis. La organización testicular se caracteriza por una agrupación celular denominada espermatocistos, que están compuestos por células germinales de un mismo estadio de desarrollo, rodeadas por una o más células de Sertoli que forman la pared del espermatocisto (Figura 13A). Las espermatogonias tienen un tamaño similar a las CGP, con un diámetro de 8 a 10 µm. Cuando se inicia al espermatogénesis, estas células se dividen por mitosis, disminuyen su tamaño y entonces se conocen como espermatocitos. Los espermatocitos se dividen por meiosis y el diámetro del núcleo se reduce nuevamente y el proceso lleva a la formación de cuatro células haploides, ahora llamadas espermátides, que tiene un diámetro de 1 a 2 µm (Figura 13B). Aunque a los 180 DDE no se han observado etapas posteriores del desarrollo gonadal, las siguientes etapas son la espermiogénesis y la espermiación; la primera etapa consiste en la maduración de las espermátides y culmina con los espermatozoides, aunque aún no se liberan de las células de Sertoli; finalmente, los espermatozoides se liberan hacia el lumen de los túbulos seminíferos por el proceso de espermiación.

IMARPE

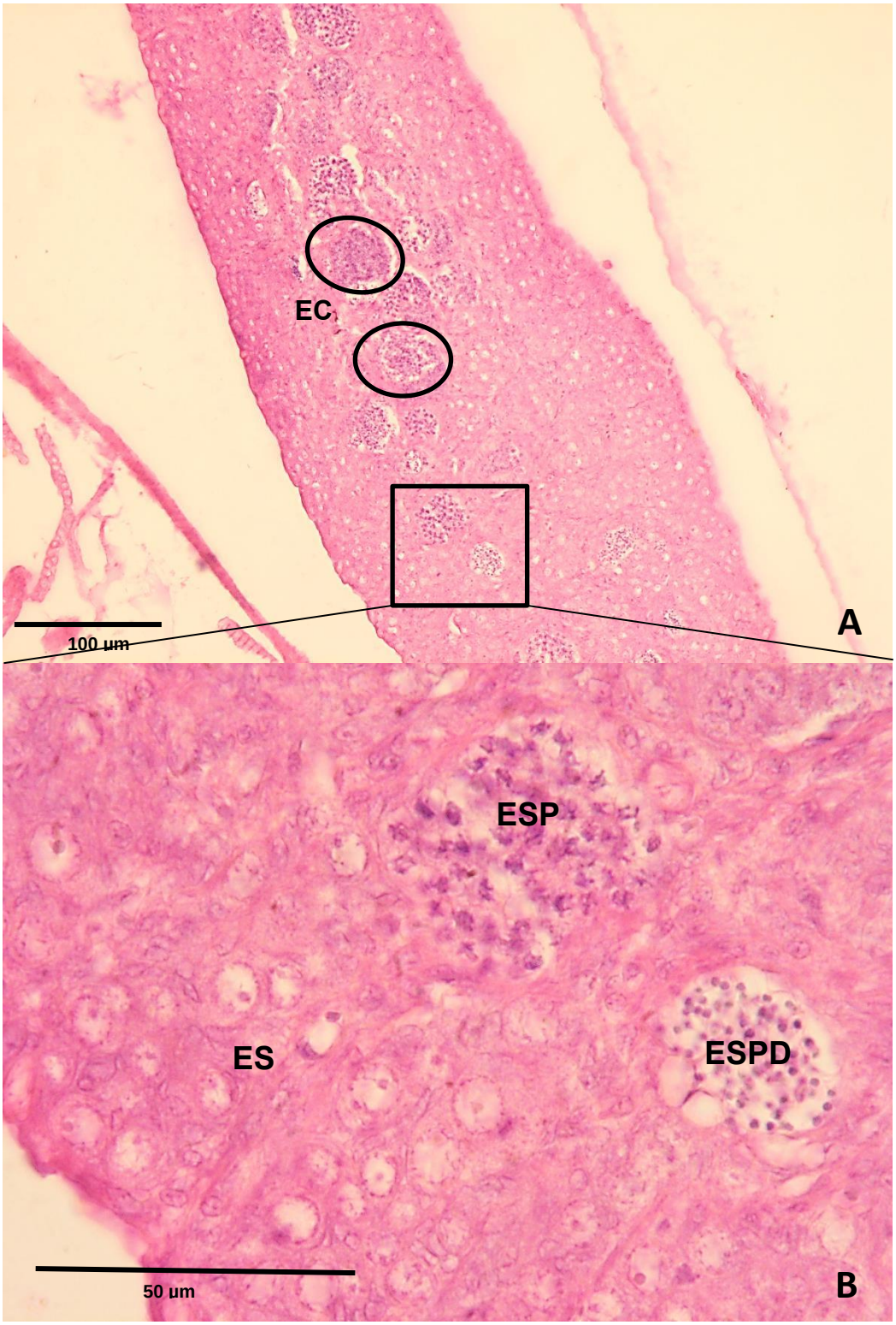


Figura 13. A, Corte histológico del testículo del lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 180 DDE. B, Detalle del testículo. EC: espermatocistos, ES: espermatogonias, ESP: espermatocitos, ESPD: espermátidas.

A partir de los resultados descritos anteriormente se puede correlacionar el proceso de diferenciación ovárica con el tamaño de los peces (Figura 14). Por lo tanto se tiene que en individuos entre los 5 y 50 mm de longitud total, correspondientes a las edades de 25 a 75 DDE, las gónadas aún se encuentran indiferenciadas y sólo se observan CGPs. En individuos de 34 a 81 mm de longitud total, que corresponden a una edad de 115 DDE, se observaron la cavidad ovárica y ovogonias. Finalmente a los 180 DDE, en individuos de 84 a 145 mm se encontraron organismos completamente diferenciados con ovocitos primarios en fase I y II. Por lo tanto, la diferenciación sexual en las hembras ocurre comúnmente entre los 35 y 80 mm, que corresponden a una edad de 75 a 115 DDE.

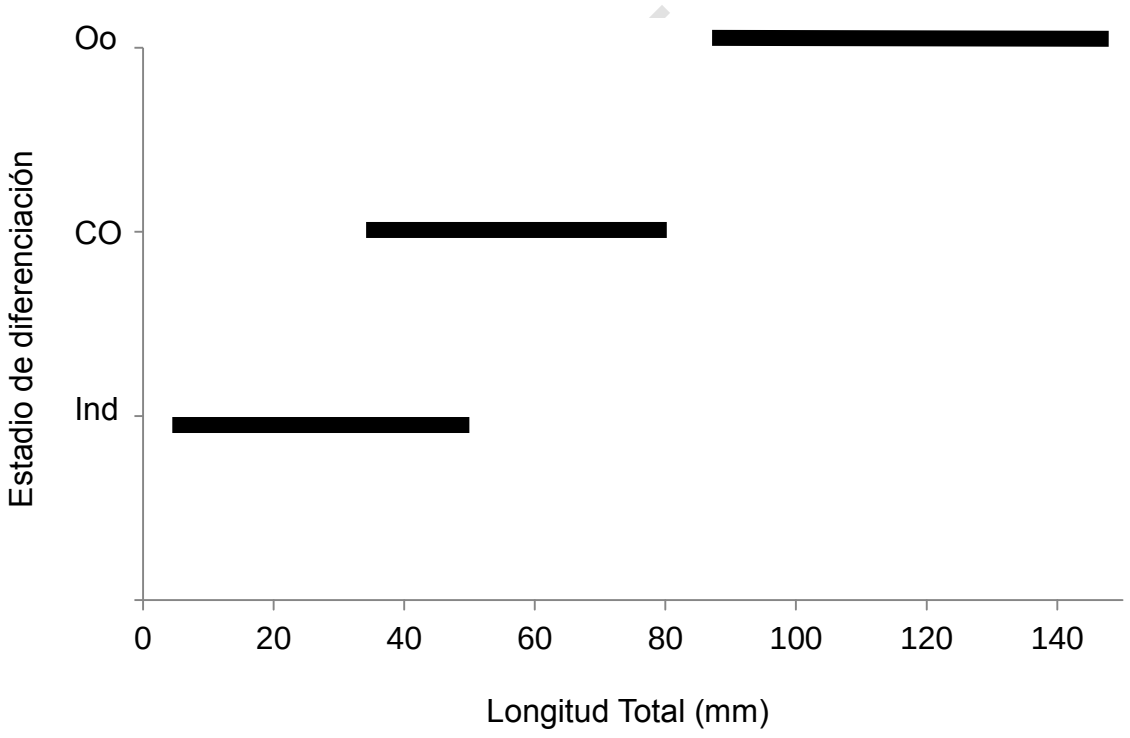


Figura 14. Estadios de diferenciación ovárica en comparación con longitud total (mm) del lenguado de California *Paralichthys californicus*. Etapas son: Ind, gónada indiferenciada; CO, cavidad ovárica; Oo: Ovocitos primarios (Fase I y II).

3.3. Evaluación de la concentración de esteroides

Se realizaron ensayos de EIA para cuantificar la concentración del E2 tanto en el alimento, vivo (*Artemia*) como en el formulado. Los resultados de las concentraciones E2 en los alimentos no tuvieron relación con la concentración proporcionada durante el enriquecimiento. Incluso en algunos casos no se pudo calcular la concentración de E2 en *Artemia* del tratamiento 3 (10 mg/kg) a partir de la ecuación proporcionada en la curva de calibración del kit debido probablemente a que la dilución realizada no fue la adecuada para dicha muestra (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de E2 cuantificada en muestras del alimento suministrado a las larvas del lenguado de California *Paralichthys californicus.*

Tratamiento	Concentración de E2 (mg/kg)	
	Artemia	Formulado
Control (0 mg/kg)	76437.64	105.83
T1 (2.5 mg/kg)	20761.53	55.28
T2 (5 mg/kg)	67908.77	305.53
T3 (10 mg/kg)	ND	399.79

ND: No determinado

IMARPE

Con el objetivo de identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual, también se evaluaron las concentraciones de E2 y 11-KT durante el desarrollo larval. Los resultados del EIA para ambas hormonas indicaron la presencia de una notoria elevación a los 35 DDE para E2 y a los 25 DDE de 11-KT, lo cual se puede asociar con el periodo lábil para la diferenciación sexual (Tabla 3). Los resultados de la concentración de E2 pertenecen a tres homogenizados diferentes, mientras que la concentración de 11-KT es solo de un homogeneizado.

Tabla 3. Concentración de E2 y 11-KT en larvas de lenguado de California *Paralichthys californicus.*

Edad de larvas	Concentración E2 (µg/g)	Concentración 11-KT (µg/g)
25 DDE	2,078.62 ± 1, 480.42	32,694.08
35 DDE	148,649.44 ± 90,070.06	6,995.43
45 DDE	2,059.72 ± 2,888.04	8,401.52
55 DDE	148.27 ± 139.36	208.30
65 DDE	1,920.00 ± 1,558.67	453.80
75 DDE	462.88 ± 654.36	1101.61
85 DDE	19.92 ± 13.25	92.70
95 DDE	199.99 ± 279.44	73.00

E2: promedio ± DE de los homogenizados

IMARPE

3.4. Evaluación de la proporción sexual

Para cuantificar la proporción de sexos (hembras:machos), cuando los lenguados tenían una edad de 180 DDE se sacrificaron y se les extrajo la gónada para procesarla mediante la técnica histológica de infiltración en parafina descrita anteriormente y con los resultados obtenidos se calculó la proporción sexual en cada uno de los tratamientos (Tabla 4).

La proporción de hembras por estanque fue 80%, 30%, 30% y 20% (proporciones H:M de 1:0.25, 1:2.33, 1:2.33; y 1:4 respectivamente). La repetición en la que se observó un número muy elevado de hembras (80%), se consideró como un valor extremo, entonces la proporción sexual se calculó solo utilizando tres repeticiones, y el resultado fue de 26.67% de hembras. La proporción sexual fue de 1:2.75 (H:M) la cual que es diferente de la proporción sexual esperada 1:1 ($X^2 = 1.6$, $p<0.05$).

INAPESCA

Tabla 4. Proporción sexual de los juveniles de lenguado de California *Paralichthys californicus* a los 180 DDE, tratados con diferentes concentraciones de E2.

Tratamiento	N	% Hembras
Control (0 mg/kg)	30	26.67(*)
T1 (2.5 mg/kg)	34	100
T2 (5 mg/kg)	32	100
T3 (10 mg/kg)	36	100

*Promedio de tres repeticiones

En los tratamientos donde los organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de 17-β estradiol, la proporción sexual resultó en un 100% de hembras para todos los casos. Además, no se registraron alteraciones histológicas tales como hipertrofia o hiperplasia gonadal en ninguno de los tratamientos. En cuanto al desarrollo ovocitario, se comparó la proporción de ovogonias (Og), ovocitos primarios en fase I (Oi) y ovocitos primarios en fase II (Oii) del control (no expuestos a hormonas) contra cada uno de los tratamientos (Figura 15). Se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento 1 (2.5 mg/kg, X^2=33.83, $p<0.05$) y el tratamiento 2 (5 mg/kg, X^2=6.12, $p<0.05$), mientras que la proporción de estas células en el tratamiento 3 (10 mg/kg) fue similar a la del control (X^2=3.83, $p>0.05$).

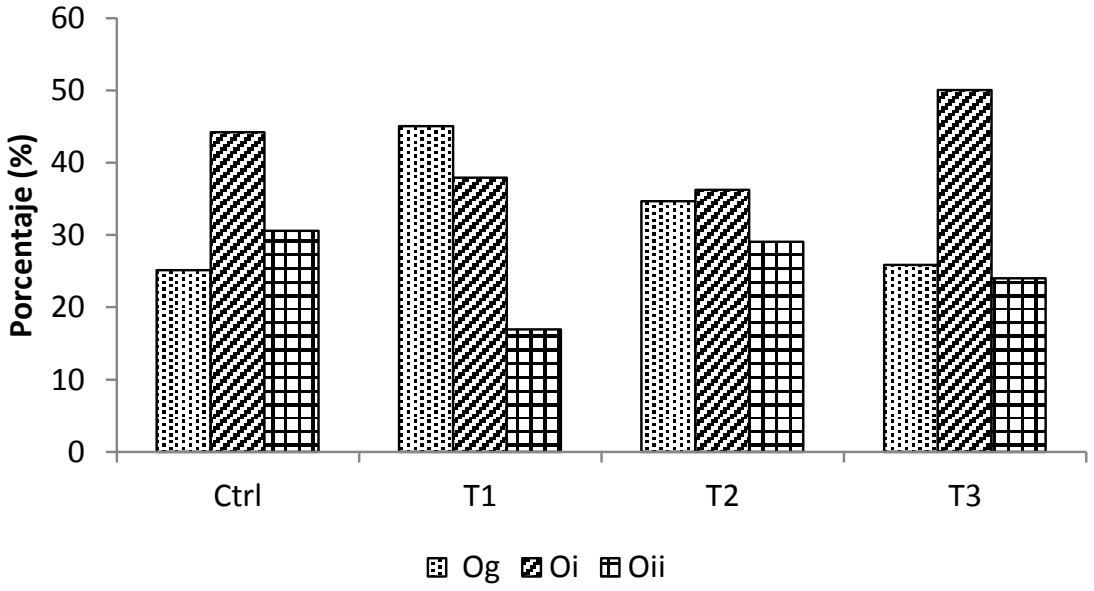


Figura 15. Proporción de ovocitos en diferentes estados de diferenciación celular en las larvas de lenguado de California *Paralichthys californicus* de 180 DDE, tratadas con cuatro concentraciones de 17-β estradiol, 0 (control), 2.5 (T1), 5 (T2) y 10 (T3) mg/kg de alimento. Og: ovogonias, Oi: ovocitos primarios en fase I, Oii: ovocitos primarios en fase II

4. Discusión

4.1. Cultivo de larvas y juveniles de lenguado

La temperatura utilizada en este estudio para el cultivo de los lenguados (larvas y juveniles) varió entre 18 a 20ºC, intervalo utilizado en diversos estudios en el lenguado de California (Gadomsky y Cadell, 1991; Gisbert et al., 2002; Conklin et al., 2003). Gadomsky y Cadell (1991) al evaluar el efecto de la temperatura sobre los primeros estadios de desarrollo concluyen que a 20ºC las larvas tienen una mayor sobrevivencia y crecimiento. Por otro lado, Gisbert et al. (2002) y Conklin et al. (2003) sugieren que a una temperatura de 18ºC las larvas tienen un desarrollo morfológico adecuado y crecen rápidamente.

En experimentos donde los organismos son expuestos a esteroides para controlar el sexo, la temperatura no debe ser una variable entre los distintos tratamientos, ya que lo que se busca evaluar es el efecto del esteroide sobre la proporción sexual y las variaciones en la temperatura podrían causar un sesgo en los resultados. El efecto de la temperatura sobre la proporción sexual se ha evaluado en diferentes especies de lenguados. Goto et al. (1999) registraron que en el lenguado *Verasper mosseri*, las progenies eran 100% machos a una temperatura de 18ºC mientras que a 14ºC el porcentaje de hembras alcanza el 50%. Este patrón de temperatura también se ha registrado en el lenguado *Limanda yokohamae* donde a una temperatura de 25ºC el porcentaje de machos se incrementa hasta un 80%, mientras que a 15ºC la proporción sexual es 1:1 (Goto et al., 2000).

En el género *Paralichthys*, se pueden citar diferentes ejemplos del efecto de la temperatura sobre la proporción sexual, aunque existe una diferencia en el patrón del efecto de la temperatura sobre la proporción sexual con respecto a *V. moseri* y *L. yokohamae*. Por ejemplo, en el lenguado japonés *P. olivaceus*, a temperaturas extremas de 15, 25 y 27.5ºC el porcentaje de machos se incrementa hasta un 100%, mientras que a 20ºC se producen un 50% de hembras (Yamamoto, 1999).

IMARPE

En caso del lenguado de sur *P. lethostigma* el patrón es similar, a temperaturas de 18 y 28ºC el porcentaje de machos es de 78 y 96% respectivamente mientras que a 23ºC la proporción sexual no difiere de 1:1 (Luckenbach et al., 2003).

La aplicación de esteroides es un método por el cual se puede modificar la proporción sexual de la progenie, favoreciendo el desarrollo de organismos con una característica de interés (e.g. mayor tasa de crecimiento, patrón de coloración), sin embargo, en algunas especies también se ha registrado un efecto directo de los esteroides sobre el crecimiento. En el presente estudio las diferentes concentraciones de estradiol no afectaron el crecimiento de los organismos durante el periodo de evaluación. Estos resultados difieren de los observados por Guarneros-Orea (2012) para los lenguados de esta especie, expuestos al estradiol mediante inmersión durante los 100 primeros DDE, ya que su longitud total fue menor que la de los lenguados que se utilizaron como control y que no se expusieron al esteroide. No obstante, este autor sugiere que es necesario verificar las diferencias en el crecimiento en periodos más largos y posteriores a la exposición al estradiol.

IMARPE

En investigaciones previas en otras especies de peces, también se ha observado que el E2 afecta el crecimiento. Johnstone et al. (1978) registraron que el E2 suministrado a una concentración 20 mg/kg de alimento formulado, disminuye el crecimiento en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, tanto en longitud y peso, durante el periodo de administración del esteroide, pero dicho efecto no se observa 5 meses después. Por lo tanto, se considera que este efecto negativo del E2 sobre el crecimiento pueda ser irrelevante en un cultivo, ya que solo disminuye la tasa de crecimiento en forma transitoria durante su aplicación en los estadios tempranos (Johnstone et al., 1978). De forma similar, en el salmón *Oncorhynchus kisutch* (Goetz et al., 1979), en el lenguado del atlántico *Hippoglossus hippoglossus* (Hendry et al., 2003), en el pez sol *Lepomis macrochirus* (Wang et al., 2008) y en esturión estrellado *Acipenser stellatus* (Khara et al., 2013), se registró una disminución del crecimiento en una relación directa con respecto a la dosis de E2.

En contraste con los trabajos anteriores, en el besugo *Chrysophrys major* (Woo et al., 1993) y en el bagre europeo *Silurus glanis* (Król et al., 2014) no se ha observado ningún efecto del estradiol sobre el crecimiento o se ha observado un efecto positivo, como en la perca *Perca flavescens* (Malison et al., 1988).

Los estudios de la fisiología reproductiva de los mamíferos han revelado que los esteroides sexuales tienen un efecto sobre el crecimiento a través de la modulación de distintos factores endocrinos, ya que modulan la producción de hormona del crecimiento (GH) y contribuyen a los patrones relacionados con el sexo de la secreción de GH actuando a nivel de la hipófisis y el hipotálamo (Le Gac et al., 1993). Cárdenas et al. (2003), en experimentos con cerebros de carpa dorada, demostraron que las hormonas sexuales esteroideas regulan la expresión de los genes de la somatostatina (SRIF), que es el mayor inhibidor de la hormona del crecimiento (GH), específicamente el estradiol actúa a nivel de la pituitaria para regular la secreción de GH mediante su influencia sobre la capacidad de respuesta a SRIF. Ya que en los fragmentos de pituitaria de organismos tratados con estradiol se observó una disminución significativa de la liberación de GH en respuesta a SRIF. A diferencia de los que ocurre en los mamíferos, en los peces el efecto del E2 en el crecimiento es variable en las especies estudiadas, por lo cual el modo de acción e interacción con otras hormonas no está claro.

IMARPE

En referencia al padecimiento patológico registrado en el cultivo a partir del día 115 DDE, no se cuantificó la prevalencia de la enfermedad con respecto a los tratamientos, sin embargo Márquez-Reyes (2009) también observó lesiones en la piel muy similares, a los 111 DDE, y las atribuyó a un protozoario (*Uronema marinum*) además de la presencia de bacterias no identificadas. Pero en dicho experimento los organismos no estuvieron expuestos a los esteroides por lo tanto no se considera que exista una susceptibilidad a enfermedades asociada al tratamiento hormonal. Por otro lado, en el cultivo de turbot (*Scophthalmus maximus*), también se han identificado infecciones ocasionadas por pseudomonas (*Pseudomona fluorescens*) y aeromona (*Aeromona salmonicida*) (Martínez-Tapia y Fernández-Pato, 1991). En tal sentido, es importante evaluar las posibles causas

del desarrollo de estas patologías así como estudiar diversos aspectos de la sanidad y patología en el cultivo del lenguado de California.

4.2. Descripción de la génesis gonadal

Goto et al. (1999) observaron una mayor correlación entre el desarrollo gonadal y la longitud total (LT), por lo que la diferenciación se puede asociar con la LT y no con la edad, contada como el número de días después de la fertilización y de esta forma se puede usar como un indicador del desarrollo gonadal.

En el presente trabajo se describió la génesis de las gónadas del lenguado de California con la intención de identificar el momento más probable durante el cual transcurre el periodo lábil para la diferenciación sexual. Los resultados histológicos mostraron que a los 25 DDE (6.96 ± 0.92 mm) se había desarrollado el primordio de las gónadas, posteriormente, a los 75 DDE (37.58 ± 6.58 mm) se observó una gónada indiferenciada. A los 115 DDE (55.93 ± 14.67 mm) se observó la cavidad ovárica, que define la formación del ovario y es una señal temprana del proceso de diferenciación sexual femenina en los peces teleósteos (Nakamura et al., 1998). A los 180 DDE (115.70 ± 17.02 mm) los ovarios tenían ovocitos primarios en fase I y II. En el caso de los machos, solo hasta los 180 DDE se observaron los testículos con espermátidas, por lo cual se puede deducir que el periodo de diferenciación de los machos es posterior al de las hembras lo cual coincide con lo reportado por Yamamoto (1999) y Viñas et al. (2013) en sus investigaciones en *P. olivaceus* y *S. senegalensis* respectivamente, donde observaron que la diferenciación ovárica precede a la diferenciación testicular.

IMARPE

Guarneros-Orea (2012) también describió la génesis gonadal para el lenguado de California y observó el primordio gonádico a los 29 DDE en larvas con una longitud de 9 a 10 mm, entre los 34 y 128 DDE las gónadas se encontraban indiferenciadas. A los 158 DDE (72 a 104 mm) las gónadas se diferenciaron en ovario y testículos, identificando la cavidad ovárica y espermatocitos respectivamente.

El presente estudio postula que el periodo lábil para la diferenciación sexual está comprendido entre los 75 y 115 DDE con longitud total entre los 35 y 80 mm, ya

que según los registros histológicos, a los 75 DDE la gónada aún se encuentra indiferenciada, mientras que a los 115 DDE ya se observa la cavidad ovárica. Guarneros-Orea (2012) postula que dicho periodo es está entre los 29 y 158 DDE que corresponden a una longitud total de 8 a 104 mm. Las diferencias en el registro de los eventos de diferenciación principalmente se deben a la diferencia en la frecuencia de muestreo entre el experimento de Guarneros-Orea (2012) y el presente trabajo.

En estudios realizados en otros lenguados también se identificado el periodo lábil, tal es el caso del lenguado japonés *P. olivaceus*, donde se observaron gónadas indiferenciadas entre los 27 y 37 mm, mientras que a los 69 mm se identificaron los ovarios. En contraste, la diferenciación de los machos fue tardía, ya que los testículos se observaron en ejemplares de 129 mm. Estos resultados indican que en el lenguado japonés, el período lábil para la diferenciación sexual se registra durante la etapa juvenil cuando los lenguados tienen una longitud total menor a los 40 mm (Yamamoto, 1999).

En otras especies de lenguados, como *V. moseri* (Goto et al., 1999) y el lenguado del Atlántico *H. hippoglossus* (Hendry et al., 2003), la diferenciación sexual ocurre en longitudes similares a la del lenguado japonés, de 35 y 38 mm respectivamente. En el lenguado brasileño *P. orbignyanus*, se ha registrado la presencia del primordio gonadal entre los 20 y 27 mm, mientras que la diferenciación gonadal de las hembras se produce entre los 41 y 75 mm de longitud total, a los 65 mm se observa la cavidad ovárica, mientras que a los 94 mm se observaron ovocitos en estado perinucleolar (o fase II). Los machos se pudieron identificar por la presencia de los lóbulos seminales en los testículos a partir de los 75 mm y a los 93 mm también se observan espermátidas (Radonic y Macchi, 2009).

En el lenguado senegalés *S. senegalensis,* la diferenciación sexual comienza antes de 98 DDE (~33 mm) y se completa alrededor de 170 DDE (~48 mm). A los 98 DDE se observaron tanto organismos indiferenciados como hembras y a los 127 DDE se identificaron machos con testículos que contenían sólo unos pocas

IMARPE

espermatogonias mientras que las hembras tenían ovarios con ovogonias y ovocitos primarios en la etapa perinucleolar o fase II (Viñas et al., 2013).

A diferencia de las especies anteriormente mencionadas, en el lenguado del sur *P. lethostigma*, cuando los lenguados tienen una longitud total de 50 a 70 mm, la gónada se encuentra indiferenciada. En las hembras, la formación de la cavidad ovárica se registró entre los 75 y 100 mm y a los 115 mm de longitud total se observaron ovocitos primarios en las etapas de la cromatina nucléolo (fase I) y perinucleolar (fase II). Para el caso de los machos con una longitud de 100 mm, aun se observaron espermatogonias, pero a partir de los 96 mm se inicia la espermatogénesis, ya que se pueden observar espermatocitos y a los 120 mm el desarrollo testicular estaba avanzado, ya que se observaron espermatocitos primarios y secundarios, espermátidas y espermatozoides (Luckenbach et al., 2003).

4.3. Evaluación de la concentración de esteroides

Los resultados de los análisis de la concentración de esteroides en los extractos tanto de K enriquecida como de alimento balanceado (Estradiol) y de larvas y juveniles de lenguado (Estradiol y 11-Ketotestosterona), resultaron contradictorias. Es posible que los solventes utilizados para la extracción de los esteroides y que recomienda el fabricante del inmunoensayo enzimático (EIA por sus siglas en inglés, Cayman Chemical) hayan extraído otros compuestos que pudieron interferir con la cuantificación. Adicionalmente, es importante tener en cuenta que los inmunoensayos comerciales como el que se utilizó en este estudio están diseñados para medir las concentraciones de esteroides en plasma, por lo cual, se sugiere desarrollar y validar un método de extracción para alimento vivo, formulado y para larvas y juveniles de peces.

La evaluación propuesta en el presente trabajo buscó determinar la dosis efectiva para la transformación del sexo, sin embargo, el método utilizado no permitió corroborar la concentración efectiva de esteroides en la dieta, no obstante, los resultados de la transformación sexual, indican que las tres concentraciones

IMARPE

utilizadas son efectivas para producir progenies femeninas (100% en todos los casos), sin ocasionar alteraciones histológicas aparentes. La revisión de la literatura relacionada con los experimentos de transformación del sexo por medio del suministro de esteroides a través del alimento, reveló que es muy común que se omitan las verificaciones correspondientes al enriquecimiento del alimento formulado, aparentemente solo hay información relacionada con las evaluaciones de la concentración del esteroide en el alimento vivo.

Martin-Robichaud et al. (1994) cuantificaron la concentración de E2 en nauplios de *Artemia* enriquecidos mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Para ello, la muestra de nauplios se liofilizó y se almacenó a -80ºC hasta su uso. Posteriormente se sonicaron en 1 ml de NaCl al 0.6%, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 0.5 h y después se centrifugaron, finalmente se hizo la extracción con éter. De modo similar, Stewart et al. (2001) utilizaron éter como solvente para la extracción de los esteroides, sin embargo, estos autores no mencionan si las muestras de nauplios se sometieron a un procedimiento preliminar y la cuantificación de la concentración de E2 se hizo nuevamente mediante RIA.

IMARPE

Los resultados de la concentración de esteroides en este estudio resultaron muy variables tanto para E2 (19 y 148 000 µg/g) como 11-KT (73 y 32 000 µg/g) y mayores que los registrados para otras especies. En la perca *P. fluviatilis,* las concentraciones de E2 variaron entre 50 y 2100 pg/g y las de 11-KT entre 25 y 2000 pg/g (Rougeot et al., 2007), mientras que en el lenguado japonés *P. olivaceus* la concentración de E2 varió entre 25 y 350 µg/g (Sun et al., 2010). Entonces, se puede considerar que el protocolo de extracción utilizado en este estudio no resultó adecuado, por lo cual es importante estandarizarlo, considerando el tipo de muestra involucrada (alimento vivo, alimento formulado o larvas).

Para la cuantificación de esteroides sexuales en larvas, se han realizado diversos estudios en diferentes especies. En algunas especies se utilizó la técnica de RIA y en otros ELISA o EIA, y los métodos de extracción de los esteroides son variables.

Feist et al. (1990) cuantificaron la concentración de esteroides mediante RIA en *Oncorhynchus kisutch*, tratando las muestras de embriones y larvas con NaOH y posteriormente los esteroides se extrajeron con dietiléter. Dichos autores encontraron que para el E2 se determinaron dos puntos de elevación en la concentración que fueron a los 49 y 77 DDE, mientras que para 11-KT se observó un incremento entre los 42 y 56 DDE seguido de una disminución durante las 2 semanas siguientes. Los cambios en los niveles de esteroides pueden ocurrir ya sea antes o durante el desarrollo gonadal, lo cual se correlaciona con la presencia de gónadas indiferenciadas hasta los 59 DDE.

Rougeot et al. (2007) y Sun et al. (2010) evaluaron la dinámica de los esteroides sexuales (T, E2 y 11-KT) durante la diferenciación sexual, en la perca de Eurasia, *P. fluviatilis* y lenguado japonés *P. olivaceus* respectivamente mediante RIA. En estos casos, las muestras se homogenizaron con etanol y posteriormente, el extracto crudo se centrifugó y se evaporó parcialmente el sobrenadante, finalmente, los esteroides se extrajeron con diclorometano. Los resultados en la perca de Eurasia, *P. fluviatilis,* mostraron que existe la elevación del E2 a los 30 y 60 DDE mientras que para 11-KT a los 10 y 60 DDE, los cuales se ubican antes y después de la diferenciación histológica de la gónada a partir de 30 y 35 DDE (Rougeot et al. 2007). Por otro lado, en lenguado japonés *P. olivaceus* la tendencia de los niveles de E2 muestra un incremento paulatino hasta el 66 DDE (LT 38 mm) seguido de una disminución (Sun et al., 2010), lo cual coincide con el periodo lábil para esta especie identificado en organismos menores a 40 mm (Yamamoto, 1999).

Por otro lado, Záblek et al. (2009) evaluaron la concentración de dos esteroides sexuales, vitelogenina (VTG) y el 11-cetotestosterona aunque no reportan la dinámica hormonal durante la diferenciación sexual del bagre *Leuciscus cephalus*, es importante considerarlo como referencia ya que la cuantificación se realizó mediante un ensayo ELISA comercial. Para ello, las muestras de los peces se homogeneizaron completamente utilizando una solución amortiguadora compuesta por Tris-HCl (pH 8.0, 50 mM), aprotinina y el inhibidor de proteínas PMSF. El homogeneizado se centrifugó 1 h y se recuperó el sobrenadante debajo de una

IMARPE

capa de grasa, a partir del cual se realizaron las mediciones. Esta técnica también se ha empleado en la medición de VTG en el pez zebra *Danio rerio* y medaka japonés *Oryzias latipes* (Örn et al., 2006).

4.4. Evaluación de la proporción sexual

La proporción sexual reportada en el medio natural para la especie *Paralichthys californicus* corresponden a edades avanzadas y es variable dependiendo de la zona de muestreo. Navarro-Mendoza M. (1985) reporta una proporción de 1:0.68 (H:M) en el estero de Punta Banda. Sunada et al. (1990) evaluaron la proporción sexual de este lenguado en las costas del sur de California y encontraron que en las áreas someras, cercanas a la costa, la proporción sexual era de 4.5:1 (H:M) mientras que en áreas de mayor profundidad la proporción era 1:1.

La proporción sexual evaluada en el presente trabajo resulta de la fertilización, si el lenguado de California tuviera un sistema de determinación sexual *XX/XY* como el que propone Yamamoto (1999) para el lenguado japonés, la proporción sexual sería 1:1. Sin embargo, si la proporción se desvía de este valor, se puede considerar otros factores que influyen sobre la diferenciación sexual, a lo cual se denomina sistema de determinación dependiente del ambiente, siendo unos de loso factores más importantes la temperatura (Devlin y Nagahama, 2002).

IMARPE

En el presente estudio la proporción sexual de los grupos control, que no estuvieron expuestos al efecto del estradiol, fue recalculada sin considerar el valor extremo de una de las repeticiones (estanque), ya que es posible que algún factor no controlado en este estanque durante el desarrollo del experimento, por lo tanto, la proporción sexual final fue 1:2.75 (H:M), lo que corresponde al 26.67% de hembras en la población. Estos resultados concuerdan con los de otras investigaciones previas sobre lenguado de California en condiciones de cultivo, donde las poblaciones son mayoritariamente de machos. Márquez-Reyes (2009) registró un 100% de machos a diferentes temperaturas desde los 15 a los 27 °C y atribuyó sus resultados a un efecto combinado de la temperatura y un estado de estrés asociado con las condiciones de cultivo como el color del tanque y la

intensidad de luz. Por otro lado, Guarneros-Orea (2012) en su investigación en lenguados cultivados a una temperatura de 16.1 ± 0.31ºC cuantificó un 16% de hembras lo que fue una proporción sexual de 1:4.26 (H:M).

En caso de ortos lenguados por ejemplo en el lenguado del atlántico *H. hippoglossus*, se observó que la población control que no había sido expuesta al E2, se registró un 53% de hembras y 47% machos, lo que dio una proporción sexual de 1:0.88 (H:M) que no fue significativamente diferente a la proporción teórica 1:1 (Hendry et al., 2003). En el turbot *S. maximus*, se ha registrado que la proporción sexual en organismos cultivados es 1:1 (Haffray et al., 2009), en el lenguado senegalés *S. senegalensis* la proporción sexual del control fue significativamente diferente de la proporción 1:1, ya que se obtuvieron 63% de machos y 37% de hembras (Viñas et al., 2013).

El control de la proporción sexual se puede hacer mediante la inducción hormonal, que ocasiona la reversión sexual de los organismos, con el fin de producir poblaciones de un solo sexo (Pandian y Sheela, 1995). Los estudios de reversión sexual mediante esteroides se han realizado en más de 50 especies de peces (Devlin y Nagahama, 2002). Para la aplicación de los esteroides es importante tener en cuenta el origen del esteroide sexual, ya sean de origen natural o sintético. En el método de feminización, comúnmente se utiliza el estrógeno natural 17β-estradiol, debido a que se ha registrado una mayor efectividad en diversas especies (Piferrer, 2001).

Para lograr una transformación efectiva, también es importante la vía de administración de las hormonas, entre las más utilizadas están la de inclusión en la dieta o la inmersión directa (Pandian y Sheela, 1995; Piferrer, 2001). Finalmente, es importante considerar el momento, duración y la dosis del tratamiento, ya que estos definen su éxito y son especie-específicos. El momento y la duración deben coincidir con el periodo lábil de la diferenciación sexual, mientras que las dosis, pueden variar sustancialmente en función de la especie y de la vía de suministro. Los tratamientos orales varían entre 5 y 500 mg/kg de alimento y las de inmersión entre 50-1000 µg/l (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

IMARPE

El control de la proporción sexual se ha practicado en otras especies de lenguados con la misma finalidad que en el presente estudio, obtener poblaciones monosexo de hembras, considerando que su tasa de crecimiento y longitud total son superiores a las de los machos (Hobbs et al., 1990). Los resultados obtenidos en el presente estudio son favorables y prometedores ya que en todos los tratamientos se obtuvo un 100% de hembras, mientras que en experiencias anteriores del control de sexo no se obtuvieron hembras ni con los tratamientos de temperatura (Márquez-Reyes, 2009) ni con baños de inmersión en E2 a 100 mg/l (Guarneros-Orea, 2012). La dosis empleada por Guarneros-Orea (2011) provocó la atrofia de las gónadas y fue muy alta en comparación con la empleada en el lenguado japonés *P. olivaceus*, de 10 µg/l, aunque no se logró incrementar el porcentaje de hembras más allá del 50% (Yamamoto, 1999).

En el presente estudio, el control de sexo se hizo con el suministro de E2 adicionado a la dieta en dos etapas, primero en el alimento vivo (nauplios de *Artemia*) de los 21 a los 50 DDE y a continuación en el alimento formulado, a partir del día 40 DDE y hasta los 158 DDE. Las dosis evaluadas resultaron efectivas para inducir el desarrollo de un 100% de hembras, las dosis se encontraban dentro del intervalo establecido para otras especies de lenguados, en las cuales se ha logrado incrementar el porcentaje de hembras hasta un 100%. Cabe destacar que en estas concentraciones no se han registrado alteraciones morfológicas en el desarrollo gonadal.

La manipulación de la diferenciación sexual en peces con esteroides exógenos se ha aplicado en diferentes especies de peces, la administración de esteroides se ha realizado por dos métodos por inmersión o en la dieta. Principalmente se realiza a través de la dieta ya que el periodo lábil para la diferenciación sexual coincide con la alimentación exógena que puede ser alimento vivo o balanceado (Devlin y Nagahama, 2002). Sin embargo para el caso del lenguado de California como se postula que el periodo lábil se encuentra entre los 75 y 115 DDE donde los peces son juveniles que han desarrollado completamente su sistema digestivo por lo tanto la aplicación del tratamiento sería utilizando el alimento formulado, lo cual facilita el tratamiento.

IMARPE

El alimento vivo (nauplios de *Artemia*) enriquecido con E2 se ha utilizado en pocas especies de peces, como en el lumpo, *Cyclopterus lumpus*, donde se logró transformar totalmente a la progenie (100% de hembras), suministrando nauplios de *Artemia* enriquecidos con 231 a 407 ng de E2/mg de alimento en base seca por un periodo comprendido de los 5 a los 24 DDE (Martin-Robichaud et al., 1994). La lubina negra *Micropterus salmoides*, es otra especie en la que también se utilizó el alimento vivo como vehículo para el suministro de una dosis de 5 mg/l (concentración del medio de enriquecimiento) durante las 10 semanas posteriores a la eclosión y el resultado fue igualmente efectivo, ya que se obtuvieron 100% de hembras (Garret, 1989).

El alimento balanceado enriquecido con E2 se ha utilizado en diferentes especies de lenguados. En el lenguado japonés *P. olivaceus*, Yamamoto (1999) obtuvo un 100% de hembras utilizando una concentración de 0.3 mg/kg desde los 41 DDE por un periodo de 30 días. En estudios posteriores en la misma especie, en lo que se evaluaron diferentes concentraciones de E2, desde los 35 hasta los 110 DDE, se obtuvieron 75% de hembras con una dosis de 0.2 mg/kg, 100% de hembras con 2 y 20 mg/kg y 93.3% de hembras a 100 mg/kg, mientras que en el control, se obtuvieron 54.5% de hembras (Sun et al., 2010).

IMARPE

En el lenguado del Atlántico *H. hippoglossus*, en los organismos tratados con una concentración de E2 de 10 mg/kg por 45 días, se incrementó el porcentaje de hembras de un 53% en control hasta el 74% en los tratados (Hendry et al., 2003). En caso del turbot *S. maximus*, se ha registrado que la proporción sexual en organismos alimentados con dietas formuladas enriquecidas con E2 a una concentración de 3 y 5 mg/mg a partir de los 35 DDE y durante un periodo de 30 a 50 días, se produjeron 100% hembras (Haffray et al., 2009). Por otro lado en el lenguado senegalés *S. senegalensis*, el suministro de E2 a través de la dieta por un periodo 70 días a partir de los 98 DDE, incrementó el porcentaje de hembras desde 37% en el control hasta el 56% en los tratados con hormona (Viñas et al., 2013).

En el presente estudio no se registraron alteraciones histológicas en las gónadas, sin embargo en experiencias previas, Guarneros-Orea (2011) observó hipertrofia

en el tejido gonadal en organismos expuestos a una dosis de 100 mg/l E2 por el método de inmersión. Sun et al. (2010) observaron hiperplasia del tejido conectivo de la gónada en el lenguado japonés expuesto a dosis de 20 y 100 mg/kg de E2 en el alimento balanceado.

Por otro lado, en este estudio se observaron diferencias en el desarrollo ovocitario de los juveniles de *P. californicus* expuestos a E2, es posible que las diferencias estén asociadas al desarrollo del organismo (longitud total) más que al efecto del E2. En otras especies de peces expuestos a esteroides se han registrado alteraciones en el proceso de desarrollo ovocitario, como en el pejerrey *Odontesthes bonariensis* expuesto a una concentración de 50 mg/kg de E2 (Strüssman et al., 1996) y en *Poecilia sphenops* expuesta a 400 mg/kg 17α-etinilestradiol (Barón, 2001). En ambas especies se registró la presencia de ovocitos atrésicos o el desarrollo precoz de ovocitos totalmente vitelados en gónadas de organismos de una edad y desarrollo equivalente.

El éxito del control de la diferenciación sexual se debe entre otras causas al momento y duración del tratamiento con esteroides, ya que es más efectivo cuando se administra justo antes de periodo natural de la diferenciación sexual (Goetz et al., 1979). Este momento varía entre las especies, debido a las grandes diferencias en las tasas de desarrollo y las condiciones ambientales propias de sus áreas de distribución natural, es por esto que el periodo lábil ocurre en diferentes momentos del desarrollo para diferentes especies, puede ser durante la embriogénesis y etapa larval en caso de *Poecilia reticulata*, etapa post-larval en la trucha *Oncorhynchus mykiss* y juveniles como en la lubina *Dicentrarchus labrax* (Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002). Es importante enfatizar que para revertir el sexo, también es crucial administrar una dosis óptima, la cual es especie-específica (Pandian y Sheela, 1995).

En el presente trabajo, se tomó como base para el diseño experimental el trabajo desarrollado por Guarneros-Orea (2012) en el lenguado de California, de tal forma que la duración del tratamiento con E2 fue de 133 días, (entre los 25 y los 158 DDE). Tomando en consideración los resultados histológicos del desarrollo

IMARPE

gonadal, es posible reducir, la duración del tratamiento hormonal a 40 días, de tal manera que inicie los días 75 DDE y culmine a los 115 DDE. A partir de los resultados de las dosis evaluadas, se propone que para lograr una feminización efectiva del 100%, la dosis para el lenguado de California se utilice la menor de las dosis aplicadas de E2 (2.5 mg/kg), ya que con esta dosis no se registraron alteraciones histológicas en las gónadas, además el gasto económico y el riesgo de contaminación por la eliminación de residuos de la hormona son menores.

IMARPE

5. Conclusiones

El protocolo de enriquecimiento de *Artemia* fue efectivo. Sin embargo no es necesaria la utilización de nauplios de *Artemia,* porque el periodo lábil coincide con la etapa de alimento balanceado.

El periodo de diferenciación sexual para las hembras en el lenguado de California se encontró entre los 75 DDE (cuando la gónada aún se encuentra indiferenciada) y los 115 DDE (cuando se observa la cavidad ovárica).

La evaluación de la dinámica de los esteroides 17β-estradiol y 11-cetosterona, no aportó información que permitiera identificar el periodo lábil.

En los lenguados cultivados a 19ºC, sin la exposición al 17β-estradiol, el porcentaje de hembras fue de 26.67%.

El suministro de 17β-estradiol desde los 25 hasta los 158 DDE, en concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/kg a través del alimento vivo (*Artemia*) y formulado, no ocasionó ningún efecto sobre el crecimiento, pero ocasionó un incremento en la proporción de hembras en la progenie del 100%. No ocasionó alteraciones histológicas en la estructura gonadal.

El suministro de alimento formulado enriquecido con una concentración de 2.5 mg/kg de 17β-estradiol durante el periodo lábil (entre los 75 y 115 DDE) promueve la feminización de los juveniles de *P. californicus*.

IMARPE

6. Recomendaciones

Estandarizar el protocolo de extracción de esteroides, teniendo en cuenta estos resultados y los de estudios previos.

Continuar con los estudios de diferenciación sexual mediante histología y cuantificación de hormonas esteroideas con la finalidad de reducir el periodo de suministro de 17β-estradiol a un tiempo menor de 40 días.

IMARPE

Lista de referencias

Allen, L.G., Jensen, R.E., Sears, J.R. (1990). Open coast settlement and distribution of young-of-the-year California halibut (*Paralichthys californicus*), along the southern California coast between Point Conception and San Mateo Point, June–October, 1988. En Haugen C.W., (Eds.). *The California halibut, Paralichthys californicus, resource and fisheries* (pp. 145–152). California Department of Fish and Game, Fish Bulletin 174.

Arellano-López, J.M. y Sarasquete-Reiriz M. (2005). Atlas histológico del lenguado senegalés, "*Solea senegalensis*" (Kaup, 1858). Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Bancroft, J. y Gamble, M. (2002). Theory and practice if histological techniques. (5a. ed.). Churchill Livingstone.

Barnhart, P. S. (1936). Marine fishes of Southern California. (15a. ed.) University of California.

Baroiller, J.F. y D'Cotta, H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology,* 130(4), 399-409.

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

Barón B. (2001). *Inducción hormonal del sexo en Poecilia sphenops.* Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.

Björnsson, B. (1994). Effects of stocking density on growth rate of halibut (< i> *Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large circular tanks for three years. *Aquaculture,* 123(3), 259-270.

Cardenas, R., Lin X., Canosa L.F., Luna M., Aramburo C. y Peter R.E. (2003). Estradiol reduces pituitary responsiveness to somatostatin (SRIF-14) and down-regulates the expression of somatostatin sst2 receptors in female goldfish pituitary. *General and comparative endocrinology,* 132(1), 119-124.

CONAPESCA. Comisión Nacional de Acuacultura y pesca. (2002 – 2011). *Anuario estadístico de acuacultura y pesca* 2002 – 2011. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca

IMARE

Conklin, D.E., Piedrahita, R.H., Merino, G.E., Muguet, J-B., Bush, D.E., Gisbert, E., Rounds, J. y Cervantes-Trujano, M. (2003). Development of California halibut, *Paralichthys californicus*, culture. *Journal of Applied Aquaculture,* 14(3/4), 143-154.

Devlin, R.H. y Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3), 191-364.

Eschmeyer, W.N., Herald, E.S., Hammann, H. (1983). *A field guide to Pacific Coast fishes of North America* (pp. 336). Boston: Houghton Mifflin Company Boston.

Extavour, C.G. y Akam, M., (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869-5884.

Feist G., Schreck C., Fitzpatrick M., Redding J.M. (1990). Sex steroid profiles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during early development and sexual differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 80(2), 299-313.

Frey, H. W. (1971). California's living marine resources and their utilization. California Department of Fish and Game.

Gadomsky D. y Cadell S. (1991). Effects of Temperature on Early-life-history Stages of California Halibut *Paralichthys californicus*. *Fishery Bulletin U.S.,* 89, 567-576.

García-López, A., Martínez-Rodríguez, G., Sarasquete, C. (2005). Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): Anatomy, histology and histochemistry. *Histology and Histopathology,* 20(4), 1179-1189.

Garrett, G.P. (1989). Hormonal sex control of largemouth bass. *Progressive Fish-Culturist*, 51(3), 146-148.

Gilbert, S.F. (2006). *Biología del desarrollo.* (7ª ed.) Médica Panamericana.

Gisbert, E., Merino, G., Muguet, H.B., Bush, D., Conklin, D.y Piedrahita, R.H. (2002). Morphological development and allometric growth patterns in California halibut (*Paralichthys californicus*) larvae. *Journal of Fish biology,* 61(5), 1217-1229.

Goetz, F.W., Donaldson, E.M. y Hunter, G.A. (1979). Effects of estradiol-17β and 17α-methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, *17*(4), 267-278.

IMARPE

Goto, R., Mori, T., Kawamata K., Matsubara, T., Mizuno, S., Adachi S. y Yamauchi, K. (1999). Effects of temperature on gonadal sex determination in barfin flounder *Verasper moseri. Fisheries Science,* 65(6), 884-887.

Goto, R., Kayaba, T., Adachi, S. y Yamauchi, K. (2000). Effects of temperature on sex determination in marbled sole *Limanda yokohamae*. *Fisheries Science,* 66(2), 400-402.

Guarneros-Orea, Y. (2012). *Descripción de la génesis gonadal e identificación del periodo lábil para la diferenciación sexual del lenguado de California, Paralichthys californicus* (Ayres, 1859). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México.

Haffray, P., Lebègue, E., Jeu, S., Guennoc, M., Guiguen, Y., Baroiller, J.F. y Fostier, A. (2009). Genetic determination and temperature effects on turbot *Scophthalmus maximus* sex differentiation: An investigation using steroid sex-inverted males and females. *Aquaculture,* 294(1), 30-36.

Hendry, C., Martin-Robichaud, D.J. y Benfey, T.J. (2003). Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture,* 219(1), 769-781.

Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E. y Shartl, M. (2007). Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC developmental biology,* 7(1), 1-10.

Hobbs, R.C., Botsford, L.W. y Kope, R.G. (1990). Bioeconomic evaluation of the culture/stocking concept for California halibut. En Haugen C.W., (Eds.). *The California halibut, Paralichthys californicus, resource and fisheries* (pp. 417-449). California Department of Fish and Game, Fish Bulletin 174.

Ish, T. y Stroman, F. (2006). California Halibut, *Paralichthys californicus*. Sustainable Fishery Advocates, Seafood Report: Final Report 28.

Johnstone, R., Simpson, T.H. y Youngson, A.F. (1978). Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*, 13(2), 115–134.

Khara H., Falahatkar B., Meknatkhah B., Ahmadnezhad M., Efatpanah I., Poursaeid S. y Rahbar M. (2013). Effect of dietary estradiol 17β on growth, hematology and biochemistry of stellate sturgeon *Acipenser stellatus*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5(2), 113-120.

IMARPE

Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. y Abe, S-I. (1999). Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Molecular Endocrinology,* 23(2), 167–176.

Król J., Pobłocki W., Bockenheimer T. y Hliwa P. (2014). Effect of diethylstilbestrol (DES) and 17 β-estradiol (E2) on growth, survival and histological structure of the internal organs in juvenile European catfish *Silurus glanis* (L.). *Aquaculture International, 22(1), 53-62.*

Kucas, S. T. y Hassler, T. J. (1986). Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Southwest) California halibut. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 82.

Le Gac F., Blaise O., Fostier A., Le Bail P-Y., Loir M., Mourot B. y Weil C. (1993). Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11(1-6), 219-232.

Le Menn, F. Cerdà, J. y Babin, P.J. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. En: Babin, P. J., Cerdà J., Lubzens E., (Eds.). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications* (pp 1 – 37). Dordrecht: Springer.

Lozán, J.L., (1992). Sexual differences in food intake, digestive tract size, and growth performance of the dab, *Limanda limanda* L. *Netherlands journal of sea research, 29(1), 223-227.*

Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V. y Borski, R.J. (2003). Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture, 216(1), 315-327*.

Luckenbach, J.A., Early, L.W., Rowe, A.H., Borski, R.J., Daniels, H.V. y Godwin, J. (2005). Aromatase cytochrome P450: Cloning, intron variation, and ontogeny of gene expression in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 303(8), 643-656.*

Luckenbach, A., Borski, R.J., Daniels, H.V. y Godwin, J. (2009). Sex determination in flatfishes: Mechanisms and environmental influences. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(3), 256-263.

Lyman-Gingerich, J. y Pelegri F. (2007). Maternal Factors In Fish Oogenesis And Embryonic Development. En: Babin, P. J., Cerdà J., Lubzens E. (Eds.). *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications* (pp 142 – 174). Dordrecht: Springer.

IMARPE

Malison, I.A., Kayes, T.B., Wentworth, B.C. y Amundson, C.H. (1988). Growth and feeding responses of male versus female yellow perch (*Perca flavescens*) treated with estradiol-17β. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45(11), 1942-1948.*

Márquez-Reyez, L. (2009).Efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual del lenguado de California, *Paralichthys californicus* (AYRES, 1859). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México.

Martin-Robichaud, D.J., Peterson, R.H., Benfey, T.J. y Crim, L.W. (1994). Direct feminization of lumpfish *Cyclopterus lumpus* L. using 17β-estradiol enriched Artemia as food. *Aquaculture*, 123 (1-2), 137–151.

Martínez-Tapia, C. y Fernández-Pato, C.A. (1991). Influence of stock density on turbot (*Scophthalmus maximus*. L.) growth.

MacNair L.S., Domeier M.L. y Chun C.S.Y. (2001). Age, growth, and mortality of California halibut, *Paralichthys californicus*, along southern and central California. *Fishery Bulletin, 99(4), 588-600.*

Miller, D.J. y Lea R.N. (1972). Guide to the coastal marine fishes of California. California Department of Fish and Game, *Fish Bulletin,* 157, 249.

Molyneaux K. y Wylie C. (2004). Primordial germ cell migration. *International Journal of Developmental Biology, 48, 537-544.*

Mori, T., Saito, S., Sugimoto, T. y Kayaba, T. (1999). Differences on growth rate among sexes of barfin flounder (*Verasper moseri*). *Scientific Reports of Hokkaido Fisheries Experimental Station (Japan),* 56, 137– 141.

Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.*, 38, 217– 229.

Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X-T. y Nagahama, Y. (1998). Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish. *Journal of Experimental Zoology, 281(5), 362-372.*

Navarro-Mendoza, M. (1985). *Ecología trófica de la comunidad íctica, en el Estero de Punta Banda*, Ensenada, México. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y Superior de Ensenada.

Örn, S., Yamani y S., Norrgren L. (2006). Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and japanese medaka after exposure to 17α-ethinylestradioland 17β-trenbolone. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51(2), 237-243.*

MARE

Ospina-Alvarez, N. y Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS ONE,* 3(7), 2837.

Pandian T.J. y Koteeswaran R. (1999). Lability of sex differentiation in fish. *Current Science*, 76(4), 580–583.

Pandian, T.J. y Sheela S.G. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138(1), 1-22.

Penman D.J. y Piferrer F. (2008). Fish Gonadogenesis. Part I: Genetic and Environmental Mechanisms of Sex Determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1), 16–34.

Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture,* 197(1), 229–281.

Piferrer, F. (2009). Determinación y diferenciación sexual de los peces. En: M. Carrillo (Ed.). *Reproducción en acuicultura (*pp. 249-336). Observatorio Español de Acuicultura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Presslauer, C., Nagasawa, K., Fernandes, J.M.O. y Babiak, I. (2012). Expression of vasa and nanos3 during primordial germ cell formation and migration in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Theriogenology*, 78(6), 1262-1277.

Radonic, M. y Macchi, G.J. (2009). Gonadal sex differentiation in cultured juvenile flounder, *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Journal of the World Aquaculture Society,* 40(1), 129–133.

Rougeot, C., Krim, A., Mandiki, S.N.M., Kestemont, P. y Mélard, C. (2007). Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Theriogenology*, 67(5), 1046–1052.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2012a). Carta Nacional Acuícola 2012. *Diario oficial de la federación.* http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/2011/06062012%20SAGARPA.pdf

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2012b). *Carta Nacional Pesquera 2012*. *Diario oficial de la federación.* http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/CARTA%20NACIONAL%20PESQUERA/24082012%20SAGARPA.pdf

Schulz, R.W. y Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry, 26(1), 43-56.*

INAPESCA

Schulz, R., Menting, S., Bogerd, J., França, L. R., Vilela, D. A. y Godinho, H. P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis-Evidence from two species belonging to different orders. *Biology of reproduction*, *73*(5), 891-898.

Shaw B. y Battle H. (1957). The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology,* 35(3), 325-347.

Stewart, A.B., Spicer, A.V., Inskeep, E.K. y Dailey, R.A. (2001). Steroid hormone enrichment of *Artemia* nauplii. *Aquaculture,* 202(1), 177-181*.*

Strüssmann C.A., Takashima, F., y Toda, K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*. 139 (1), 31.45.

Strüssmann C.A. y Nakamura M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry,* 26(1), 13–29.

Sun, P. You, F., Liu, M., Wu, Z., Wen, A., Li, J., Xu, Y. y Zhang, P. (2010). Steroid sex hormone dynamics during estradiol-17β induced gonadal differentiation in *Paralichthys olivaceus* (Teleostei)*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology,* 28(2), 254-259.

Sunada, J.S., Velez, P.V. y Pattison, C.A. (1990). Age, size, and sex composition of California halibut from southern California commercial fishery landings. En Haugen C.W., (Eds.), *The California halibut, Paralichthys californicus, resource and fisheries* (pp 303-319). California Department of Fish and Game, Fish Bulletin 174.

Tave, D. (1993). *Review of basic genetics* (pp. 7–20). Genetics for Fish Hatchery Managers. Van Nostrand Reinhold.

Viñas, J., Asensio, E., Cañavate, J.P. y Piferrer, F. (2013). Gonadal sex differentiation in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and first data on the experimental manipulation of its sex ratios. *Aquaculture*, 384, 74–81.

Wang, H.P., Gao, Z.X., Beres, B., Ottobre, J., Wallat, G., Tiu, L., Rapp, D., O'Bryant, P. y Yao, H. (2008). Effects of estradiol-17 beta on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture*, 285(1), 216–223.

Woo, N.Y.S., Chung, A.S.B. y Ng, T.B. (1993). Influence of oral administration of estradiol-17β and testosterone on growth, digestion, food conversion and metabolism in the underyearling red sea bream, *Chrysophrys major*. *Fish Physiology and Biochemistry,* 10(5), 377–387.

IMAPPE

Yamamoto, T. (1969). Sex differentiation. En: Hoar, W., Randall, D. (Eds.), *Fish Physiology (*pp. 117– 175)*.* Academic Press.

Yamamoto, E. (1999). Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, 173(1), 235-246.

Yoneda, M., Kurita, Y., Kitagawa, D., Ito, M., Tomiyama, T., Goto, T. y Takahashi, K. (2007). Age validation and growth variability of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* off the Pacific coast of northern Japan. *Fisheries Science,* 73(3), 585-592.

Záblek, V., Randák, T., Kolárova, J., Svobodová, Z. y Kroupová H. (2009). Sex differentiation and vitellogenin and 11-ketotestosterone levels in chub, *Leuciscus cephalus* l., exposed to 17 b-estradiol and testosterone during early development. *Bulletin of environmental contamination and toxicology, 82(3), 280-284.*

Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A. y Molés, G. (2009). Regulación Y Control Hormonal Del Proceso Reproductor De Los Teleósteos. En: M. Carrillo (Ed.). *Reproducción en acuicultura (*pp. 97 – 154). Observatorio Español de Acuicultura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

IMARPE

APÉNDICES

Apéndice 1

Solución fijadora Davidson

Para preparar 1 litro de solución:

- 100 ml Glicerina 100 ml
- 200 ml Formaldehído 37%
- 300 ml Etanol 96%
- 300 ml Agua de mar filtrada
- 10ml Ácido Acético

Agitar antes de usarse.

IMARPE

Apéndice 2

Técnica de deshidratación

Reactivo	Tiempo (h)
Etanol 70%	1
Etanol 96% - I	2
Etanol 96% - II	2
Etanol 100% - I	2
Etanol 100% - II	2
Etanol 100% - Benceno	3
Benceno I	2
Benceno II	2
Benceno – Parafina	3
Parafina I	2
Parafina II	2

IMARPE

El tiempo total fue de 23 horas, posteriormente las muestras se incluyeron en parafina.

Apéndice 3

Técnica de tinción de Hematoxilina – Eosina/Floxina

Previo a la tinción las muestras se deben desparafinar e hidratar en agua.

1. Desparafinación e Hidratación:

Reactivo	Tiempo
Xileno I	5 min
Xileno II	5 min
Etanol 100% - I	15 inmersiones
Etanol 100% - II	15 inmersiones
Etanol 95% - I	15 inmersiones
Etanol 95% - II	15 inmersiones

Lavar en agua corriente por 5 min, hasta que el Xileno no flote en agua.

IMARPE

2. Tinción Hematoxilina – Eosina/Floxina.

Reactivo	Tiempo
Hematoxilina de Harris	5 min (efectuar agitación)
Lavar en agua corriente	5 min
Alcohol ácido	1.5 min (efectuar agitación)
(0.3 ml HCl/200 ml 70% ETOH)	
Lavar en agua corriente	3 min
Carbonato de Litio	2 min
Lavar en agua corriente	3 min
Enjuagar con agua destilada	
Etanol 96%	10 sumergidas
Eosina “Y”	45 s (efectuar agitación)
Etanol 95% - I	6 inmersiones
Etanol 95% - II	6 inmersiones
Etanol 100% - I	10 inmersiones
Etanol 100% - II	10 inmersiones
Xileno – I	3 min
Xileno – II	5 min
Xileno – III	5 min

IMARPE

.