



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**LABORATORIO DE ACUACULTURA TROPICAL**

**MANEJO REPRODUCTIVO DEL ROBALO MEXCANO**  
***Centropomus poeyi* EN CONDICIONES DE CAUTIVERIO**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y MANEJO  
DE SISTEMAS TROPICALES

**PRESENTA:**

M. EN C. A JUAN MANUEL VIDAL LÓPEZ

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. WILFRIDO MIGUEL CONTRERAS SÁNCHEZ

VILLAHERMOSA, TABASCO. MARZO 2020



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN

FEBRERO 07 DE 2020

**C. JUAN MANUEL VIDAL LÓPEZ  
PAS. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y  
MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES  
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales titulado: **"MANEJO REPRODUCTIVO DEL ROBALO MEXICANO *Centropomus poeyi* EN CONDICIONES DE CAUTIVERIO"**, asesorado por el Dr. Wilfrido Miguel Contreras Sánchez, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por la Dra. Claudia Elena Zenteno Ruiz, Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal, el Dr. Wilfrido Miguel Contreras Sánchez, Dra. Martha Alicia Perera García, Dra. Judith Andrea Rangel Mendoza, Dra. Wendy del Carmen Arévalo Frías y Dr. Stefan Louis Arriaga Weiss.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**DR. ARTURO GARRIDO MORA**  
**DIRECTOR**

C.c.p.- Expediente del Alumno.  
C.c.p.- Archivo

DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

## CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de doctorado denominado: **“MANEJO REPRODUCTIVO DEL ROBALO MEXICANO *Centropomus poeyi* EN CONDICIONES DE CAUTIVERIO”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 06 días del mes de febrero de dos mil veinte.

AUTORIZO



---

JUAN MANUEL VIDAL LÓPEZ

## DEDICATORIA

*"Cuanto más oscura es la noche, más brillantes son las estrellas. Cuanto más profundo es el duelo, más cercano está Dios." Dedico este trabajo a Dios ya que sin su acompañamiento en la vida y enseñanzas diarias hoy no podría estar aquí escribiendo estas últimas líneas.*

*A mis padres fuente de experiencia y vida...especialmente a mi madre por su interés y apoyo al inicio de mi vida profesional.*

*A mis esposa e hijos por estar siempre y a cada momento en las buenas y las malas de principio a fin, este logro en mi vida es de ustedes.*

*A todas aquellas personas que han dejado un legado en mi vida les dedico este esfuerzo es imposible mencionarlos a cada uno, pero han sido parte fundamental de mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

A un gran amigo mi principal impulsor académico **Dr. Wilfrido Miguel Contreras Sánchez** fueron tres logros de tres, por nuestras diferencias y coincidencias, agradezco su atención, apoyo y su amistad, gracias por cada minuto de trabajo en conjunto que hoy se ven culminados en este documento y en las publicaciones obtenidas.

A mi comité de sinodales por sus comentarios, sugerencias y por enriquecer cada uno de las líneas de esta investigación.

Especial agradecimiento a la **Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal** y a la Maestra **Arlette Amalia Hernández Franyutti** por su valioso apoyo en cuestiones histológicas y de revisión e interpretación de las mismas. Gracias infinitas porque sin su ayuda esto no sería hoy una realidad.

No puedo dejar de mencionar a mi gran amigo **M. en C. A. Aaron Alejandro Torres Martínez**, mis respetos y admiración por todo lo que me apoyaste durante este tiempo y por impulsarme a concluir esta investigación y sobre todo por tu amistad.

A la **M. en C. A. María de Jesús Contreras García**, gracias por tu total apoyo por tu amistad y por escucharme durante el tiempo en que estuve realizando esta investigación.

Al **M. en C. A. Alejandro Mcdonald Vera** por tu apoyo en los viajes de recolecta y por las teorías que platicábamos en el laboratorio acerca de los robalos, fueron de mucha ayuda a la hora de entender y escribir este documento.

A mi buen amigo el **Biól. Felipe Ramón Zapata**, gracias porque en muchas ocasiones me ayudaste con los robalos; cuidarlos y alimentarlos como si fueran tuyos, pero sobre todo por tus consejos, por incitarme a concluir y titularme y sobre todo por tu amistad.

Me llevaría mucho tiempo y hojas escritas para mencionar a cada una de las personas que de una u otra manera participaron en la presente investigación, no me queda más que darles las gracias a todas ellas

## Contenido

<b>CAPITULO 1</b> Protocolo de Tesis.....	<b>1</b>
<b>CAPITULO 2</b> Early gonadal differentiation in the Mexican snook <i>Centropomus poeyi</i> (Centropomidae, Perciformes, Teleostei) suggests protandric hermaphroditism... <b>34</b>	
<b>CAPITULO 3</b> Functional feminization of the Mexican snook ( <i>Centropomus poeyi</i> ), using 17 $\beta$ -estradiol in the diet.....	<b>77</b>
<b>CAPITULO 4</b> Reversión sexual de machos adultos funcionales de <i>Centropomus poeyi</i> usando implantes de 17- $\beta$ estradiol.....	<b>108</b>
<b>CAPITULO 5</b> Conclusiones Generales.....	<b>138</b>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

# **CAPITULO 1:**

Protocolo de tesis

# 1. Introducción

El grupo de los robalos constituye una de las pesquerías más importantes del Golfo de México. Su importancia económica se debe a que son considerados como alimento de alto valor proteínico, forma parte de la pesca artesanal y deportiva de aguas interiores y costeras, y actualmente es considerada como una especie con potencial para la acuicultura. Debido a estas características, se ha generado una fuerte explotación del recurso, ocasionando que las capturas disminuyan; particularmente, los organismos tallas mayores a los 90 cm, que generalmente son hembras, provocando que las poblaciones silvestres disminuyan (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Mollejón, 2001; Álvarez-Lajonchere *et al.*, 2004; Perera-García *et al.*, 2008; Loran-Núñez *et al.*, 2012).

Por ello, investigadores de países como Estados Unidos, Cuba, Puerto Rico y Brasil han externado su preocupación por llevar a cabo acciones que aseguren la continuidad del manejo de este recurso, enfocándose principalmente a especies como el robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) y el robalo chucumite (*Centropomus parallelus*) (Tucker y Campbell, 1988; Taylor *et al.*, 1998; Álvarez-Lajonchere *et al.*, 2002; Cerqueira y Tsuzuki, 2009). En México, los principales avances sobre manejo en cautiverio se han realizado en los estados de Yucatán y Tabasco con el robalo blanco y el robalo chucumite (Sánchez *et al.*, 1999; Contreras, 2011; Ibarra-Castro *et al.*, 2011). Los estudios realizados hasta el momento se han dirigido hacia la inducción del desove y la obtención de larvas; las cuales han sido adaptadas con alimento comercial, no obstante, a los avances, es necesario redoblar esfuerzos en la obtención de una metodología que funcione de manera adecuada y que genere certeza en la conservación del recurso (Ibarra-Castro *et al.*, 2011; Contreras, 2011; Sánchez *et al.*, 1999).

Respecto al robalo prieto (*Centropomus poeyi*), los estudios realizados sobre su biología y ecología son escasos; no obstante, que es la segunda especie más apreciada después del robalo blanco (Chávez, 1981). Esta especie presenta características muy atractivas tales como, tallas máximas notables de hasta 88.5



cm, son animales robustos y al estudiar la relación peso-longitud este autor concluye que las hembras son más grandes y pesadas que los machos (Chávez, 1981). Ocurre en la vertiente y costas del Golfo de México, desde Tampico, Tamaulipas hasta la Laguna de Términos en el estado de Campeche; sin embargo, algunos autores señalan que su distribución se limita hasta Frontera, Tabasco (Chávez, 1981). En cuanto al comportamiento reproductivo se tiene poca información, por lo cual se asume que es igual que el resto de los robalos, es decir, es considerada una especie protándrica hermafrodita que madura sexualmente primero como macho y posteriormente cambia a hembra. Se sabe que pasa la mayor parte de su ciclo de vida en ambientes dulceacuícolas y cuando adultos migran periódicamente al medio marino durante la temporada reproductiva (Chávez, 1981; Caballero, 1996; Tringali y Bert, 1996; Peters *et al.*, 1998).

Como especie con un alto potencial para acuicultura, se requieren estudios enfocados al conocimiento de la biología reproductiva en condiciones controladas, por ejemplo: alcanzar los primeros estadios de maduración en cautiverio, una vitelogénesis completa y estimular el proceso de la maduración final ovocitaria que permita la inducción al desove mediante el uso de hormonas análogas. Esto permitirá la obtención de huevos, larvas y juveniles que puedan ser incorporados a la acuicultura. También es urgente realizar estudios orientados al conocimiento del desarrollo gonádico temprano y su diferenciación sexual para definir a ciencia cierta si la especie es hermafrodita protándrica. Esta información servirá de referencia para implementar estudios de inversión sexual orientada a producir hembras reproductivas viables de tallas más pequeñas que permitan terminar con la dependencia de hembras reproductoras de gran tamaño, provenientes del medio silvestre.

En el presente estudio, se pretende generar conocimiento básico y aplicado que permita establecer pautas de manipulación del ciclo reproductivo del robalo prieto *C. poeyi*, en condiciones de cautiverio, contribuyendo así a la conformación de un paquete tecnológico para el manejo y conservación de esta especie.

## 2. Antecedentes

### 2.1.- Posición taxonómica, distribución geográfica y aspectos generales

El grupo de los robalos pertenece al orden Perciformes, suborden Percoidei y a la familia Centropomidae, la cual contiene el género *Centropomus*. La distribución de este grupo de peces es endémica de ambos litorales tropicales del continente americano, con 12 especies muy semejante en sus características anatómicas y morfológicas (Nelson, 2006; Castro-Aguirre *et al.*, 1999). En las costas del océano Pacífico ocurren *C. medius*, *C. viridis*, *C. robalito*, *C. unionensis*, *C. armatus* y *C. nigrescens*; mientras que las costas del Atlántico se presentan *C. pectinatus*, *C. undecimalis*, *C. ensiferus*, *C. parallelus*, *C. mexicanus* y *C. poeyi* (Rivas, 1986). En el caso de *C. poeyi* su distribución parece ser endémica de México, aunque es posible que su distribución alcance las costas de Belice, la vertiente y costas del Golfo de México, desde Tampico, en el estado de Tamaulipas, hasta la Laguna de Términos en el estado de Campeche (Chávez, 1981).

Los robalos habitan en ambientes acuáticos continentales y en zonas estuarinas no muy profundas con presencia de manglares y generalmente con sustratos pedregosos, su carne es color blanca, suave y agradable al paladar, son especies catádromas las cuales prefieren aguas saladas para su reproducción y posteriormente, los juveniles migran hacia aguas salobres o dulces (Rivas, 1986; Cerqueira, 2002). Estos animales tienen un régimen carnívoro, prefiriendo peces y crustáceos, estos últimos representan gran parte de la dieta de los juveniles (Chávez, 1963, Fuentes, 1973).

### 2.2.- Manejo en cautiverio del robalo prieto

Con base en algunas características biológicas de las especies, se han realizado algunos estudios para generar una tecnología que permita la producción masiva de alevines, juveniles, y el proceso de la engorda de estas especies en cautiverio. Si bien es cierto, que el cultivo del robalo asiático *Lates calcarifer* ya es una realidad,

para las especies de robalos en México y el continente americano no se da la misma situación, aunque los esfuerzos más sobresalientes a nivel experimental han sido enfocados a *C. undecimalis* y *C. parallelus*. Para el caso de *C. poeyi*, a pesar de ser la segunda especie de mayor importancia en el Golfo de México los esfuerzos han sido encaminados solo a evaluar aspectos de sus pesquerías (Loran-Núñez *et al.*, 2012; Perera-García *et al.*, 2008; Chávez, 1981). En nuestro país, dos instituciones han llevado a cabo el manejo de especies de robalos en cautiverio; la UNAM en sus instalaciones de Sisal, Yucatán, donde se trabaja con *C. undecimalis* y la UJAT en sus instalaciones de la Estación de Acuicultura Marina de Jalapita, Tabasco. En esta última, se ha trabajado con *C. undecimalis*, *C. parallelus* y *C. poeyi*. La mayoría del trabajo se ha enfocado a acondicionar grupos de robalos al manejo en cautiverio y a realizar investigaciones sobre reproducción inducida con hormonas comúnmente usadas en acuicultura.

### **2.3.- Mecanismos de determinación, diferenciación y reversión sexual en peces teleósteos.**

Se han propuesto diversos modelos para tratar de explicar el proceso de determinación sexual en peces teleósteos como el homogamético-heterogamético y el autosomal-multifactorial (Trombka y Avtalion, 1993). La determinación sexual se define como la suma de elementos genéticos que son responsables de la existencia de las gónadas y depende de la combinación de los cromosomas de ambos progenitores (Baroiller *et al.*, 1999). Los genes determinantes del sexo son los responsables de la presencia de las gónadas, de la forma, diferenciación a testículo u ovario y la presencia o ausencia de cavidad ovárica (Piferrer, 2001). Se sabe que la expresión sexual en los peces teleósteos puede verse afectada por factores genéticos, sociales y ambientales que pueden desviar la proporción 1:1 machos: hembras (Piferrer, 2001; Devlin y Nahagama, 2002). Estos factores pueden afectar la orientación de las células germinales y somáticas dentro de la gónada primordial (Piferrer y Donalson, 1989 y 1994; Piferrer, 2001; Devlin y Nahagama, 2002). El desarrollo de las gónadas y la diferenciación de estas en peces teleósteos están controlados por hormonas de la glándula pituitaria (gonadotropinas) y

regulados por la liberación de los factores de las gonadotropinas (GnRH) y otras moléculas de origen neuroendocrino y gonádico (Pandian y Sheela, 1995; Piferrer, 2001; Devlin y Nahagama, 2002). Es por ello, que la descripción del desarrollo gonádico temprano es un aspecto importante en los peces, debido a que permite conocer la estructura, morfología y el momento exacto en que ocurre la diferenciación sexual de las gónadas. Este proceso incluye diferentes eventos que tienen lugar en los primordios gonádicos, tales aspectos van desde la migración de las células germinales primordiales (CGPs), la formación de las crestas germinales de las gónadas indiferenciadas, hasta la diferenciación a testículos u ovarios. En peces teleósteos gonocóricos se ha demostrado que la diferenciación sexual ocurre primero en las hembras y posteriormente en los machos, aunque, se ha reportado que en las tilapias *O. mossambicus* y *O. niloticus* el proceso de diferenciación sexual ocurre simultáneamente en ambos sexos (Patiño *et al.*, 1996; Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

El proceso de reversión sexual es una adaptación que ocurre en los peces teleósteos que presentan hermafroditismo. El hermafroditismo, se presenta en aquellas especies en las cuales en un mismo individuo se observan gónadas con tejidos ovárico y testicular. Se conocen básicamente tres tipos de hermafroditas: los secuenciales (protándricos y protóginos), los simultáneos (sincrónicos continuos y asincrónicos) y los seriales (Pandian, 2012; Gómez, 1995; Caballero, 1996). Para explicar este fenómeno existen al menos cuatro modelos, el primero considera que la reversión sexual ocurre en tallas y edades diferentes, es un fenómeno continuo y prolongado, pero que, al llegar a la primera madurez sexual, solo una parte de la población cambia de sexo y de la misma manera ocurre en los próximos eventos reproductivos y así sucesivamente. Otros dos modelos se fundamentan en la necesidad y dificultad de los individuos de encontrar pareja, estos modelos son denominados hermafroditismo por densidad poblacional baja y dispersión de genes. Finalmente, el modelo de la cuota sexual menciona que los individuos cambian de sexo porque en el próximo acto reproductivo tendrían más éxito que con el sexo actual, este proceso es activado por cambios demográficos o alteraciones de comportamiento en el sistema social en el cual viven y como consecuencia de

interacciones con otros individuos (Ghiselin, 1969; Gómez, 1995; Nakashima *et al.*, 1995; Allsop, 2003). En robalos existen evidencias histológicas que demuestran que son hermafroditas protándricos, debido a que, durante su ciclo de vida, inician su maduración sexual como machos y después ocurre un proceso de reversión sexual a hembras; esta condición ha sido evidente en gónadas en periodo de cambio de sexo con *C. undecimalis* donde se han encontrado simultáneamente lamelas ovígeras y conductos que contienen esperma (Taylor *et al.*, 2000).

Hasta el momento no se han llevado a cabo estudios para conocer este proceso de manera más precisa en los robalos. Sin embargo, un estudio sobre estructura poblacional realizado en el Rio Grande en Texas, EE. UU., sugiere que los juveniles de robalo blanco a tallas de hasta 360 mm de longitud presentan epitelio germinal y conducto espermático definido, característico de testículos diferenciados en peces teleósteos (Huber, 2007).

#### **2.4.- Obtención de poblaciones monosexo y su fundamento teórico**

La plasticidad del desarrollo sexual de los peces teleósteos permite manipular el proceso de diferenciación sexual y puede ser efectiva aún con la presencia del material genético que determina el sexo (Yamamoto, 1969; Trombka y Avtalion, 1993; Pandian y Sheela, 1995; Piferrer, 2001; Devlin y Nahagama, 2002; Goudie *et al.*, 1983). La base de esta teoría fue propuesta por Yamamoto (1969) quien menciona que al final de la cascada de eventos, los esteroides sexuales son los inductores naturales responsables del proceso de diferenciación gonádica. La sensibilidad para la inversión del sexo inducida por un esteroide ha sido base para el desarrollo de técnicas para la obtención de poblaciones monosexo en varias especies de peces (Baroiller *et al.*, 1999). Sin embargo, dicha propuesta no prueba que los esteroides son los inductores naturales de la diferenciación gonádica, pero proporciona elementos que han servido para explorar el proceso fisiológico de la diferenciación sexual en peces (Pandian y Sheela, 1995; Piferrer, 2001; Devlin y Nahagama, 2002). La inversión sexual es el proceso mediante el cual una gónada indiferenciada y genéticamente comprometida hacia un sexo en particular es

inducida para desarrollarse hacia otro sexo (Pandian y Sheela, 1995; Piferrer, 2001; Devlin y Nahagama, 2002). Este proceso está regulado por la capacidad de las células germinales de diferenciarse en ovogonias o espermatogonias. Pero también este evento funciona como un estímulo del desarrollo de células germinales determinadas del segundo sexo-quiescente (Devlin y Nahagama, 2002; Omoto *et al.*, 2002). Los estudios de inversión sexual en peces han permitido el control de aspectos tales como: la reproducción en organismos precoces, control mismo del evento reproductivo, manipulación del sexo para obtener un sexo en particular con características deseables para su cultivo y la obtención de organismos reproductivamente viables a tallas más tempranas.

La inversión sexual, mediante el uso de hormonas sintéticas en peces, como proceso para la obtención de poblaciones monosexo puede ser orientada en dos vertientes: obtención de poblaciones de sólo machos (masculinización) o bien la producción de poblaciones de sólo hembras (feminización). Los métodos más empleados para la obtención de poblaciones monosexuales son la separación manual, la cual, es efectiva en organismos adultos y se fundamenta en la observación directa de la forma de la papila urogenital, esta técnica presenta ciertas desventajas en aquellas especies que no presentan diferencias estructurales en la forma de la papila. Otro método es la hibridación, el cual consiste en la cruce selectiva de organismos para producir machos y/o hembras con características deseables. Un tercer método incluye la administración oral de esteroides, en esta técnica el esteroide se adiciona al alimento que sirve como vehículo para hacer llegar el esteroide al individuo. En el tratamiento por inmersión, la hormona es disuelta en agua y los alevines se introducen por periodos cortos o prolongados según convenga (Green *et al.*, 1997). Finalmente, la técnica de bio-encapsulado o enriquecimiento en nauplios de *Artemia* sp, consiste en añadir el esteroide al agua de incubación o de cultivo por un tiempo determinado con la finalidad de que dichas sustancias se adhieran a los tejidos de los nauplios de artemia y sirvan como vía para transportar el compuesto a los alevines de peces (Stewart *et al.*, 2001, Vidal-López *et al.*, 2012).

Los esteroides comúnmente empleados para inducir el desarrollo de un sexo en particular son la 17- $\alpha$  metiltestosterona con efecto masculinizante y el 17- $\beta$  estradiol, que presenta propiedad feminizante. La diversidad de los estudios para demostrar la efectividad de estas hormonas sintéticas en peces ha quedado demostrada en diversas publicaciones. Entre ellas, encontramos los estudios realizados por Johnstone *et al.* (1978) con *Oncorhynchus mykiss*, Goudie *et al.* (1983) con bagre de canal *Ictalurus punctatus*, Nakamura (1984) con *O. keta*, Happe y Zohar (1988) con la dorada *Sparus aurata* y Colombo y Grandi (1990) con *Anguilla anguilla*. Por otro lado, se ha observado que en el pargo de cabeza negra *Acanthopagrus schlegelii* es posible inducir la inversión del sexo obteniéndose porcentajes de hasta 100% de hembras utilizando estradiol en la dieta a razón de 4 mg/kg de alimento por cinco meses de tratamiento (Chang y Lee, 1992). Otros reportes como el Strüssmann *et al.* (1996), donde utilizando alimento impregnado del esteroide E2 a dosis de 20 y 50 mg/kg de alimento desde 105 a 179 días lograron obtener 100 % hembras en el pejerrey *Odontestis bonaerensis*. En el caso del robalo blanco, Vidal *et al.* (2012) realizó un estudio con juveniles silvestres, para evaluar el efecto de la aplicación 17- $\beta$  estradiol vía oral mediante una estrategia de sustitución parcial del alimento, aplicando una dosis de 50 mg/kg de alimento a diferentes tiempos de exposición. Los resultados muestran que a partir de los 21 y hasta los 42 días de tratamiento se pueden obtener porcentajes altos de feminización variando entre 87% y 93%.

## **2.5.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada en peces teleósteos**

Los sistemas nervioso y endocrino de los vertebrados actúan de manera sincronizada para coordinar el evento reproductor de los teleósteos, siendo el eje hipotálamo-hipófisis-gónada el que controla dicho proceso. El funcionamiento general del control hormonal que ejerce el sistema neuroendocrino sobre el proceso de ovogénesis y espermatogénesis es el siguiente: fotorreceptores de la retina o quimiorreceptores del epitelio olfatorio son los encargados de captar y convertir los estímulos ambientales en señales electroquímicas que se dirigen vía neuronas sensoriales al cerebro y de ahí al hipotálamo, donde son procesadas induciendo a

la secreción de hormonas peptídicas como GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y en ciertas especies el GRIF (factor inhibidor de la liberación de gonadotropina). Estas hormonas se dirigen a la glándula pituitaria donde inducen y regulan la producción de las hormonas gonadotropinas, que luego son liberadas al torrente sanguíneo por donde circula hasta llegar a las gónadas, órganos productores de esteroides ( $E_2$  y T, principalmente) que son los que directamente controlan el desarrollo gonadal (Patiño, 1995).

## **2.6.- Biología reproductiva en el robalo prieto**

Existen algunos estudios relacionados con aspectos de la biología reproductiva de esta especie. Chávez (1963) y Fuentes (1973) en la Laguna de Alvarado en Veracruz, México; Carvajal (1975) hizo un estudio en la Laguna de Términos en el estado de Campeche. Con relación a la madurez sexual para robalo prieto están los trabajos de Chávez (1963) y Carvajal (1975), pero no hacen referencia acerca de la talla 50 % ( $L_m$ ) como indicador en la que las hembras alcanzan la madurez sexual. El máximo pico reproductivo para el robalo prieto en la Laguna de Alvarado, Veracruz se presenta en el mes de julio. La temporada de reproducción abarca los meses de junio a septiembre, en este estudio se observan machos en estado reproductivo hasta el mes de septiembre; caso contrario sucede con las hembras las cuales solo se observan hasta agosto (Loran-Núñez *et al.*, 2012). Las tallas de madurez sexual en estadios IV al V (Nikolsky, 1963) para machos fue de 72.7 cm de longitud total, mientras que para hembras considerando los estadios IV al VII fue 73.8 de longitud total; la hembra más pequeña reportada fue de 60 cm (Loran-Núñez *et al.*, 2012). Al parecer en esta especie la temporada de reproducción puede variar de acuerdo con la zona o región como sucede con el robalo blanco (Marshall, 1958; Chávez, 1961; Chávez, 1963; Taylor *et al.*, 1998; Tucker *et al.*, 1987; Caballero *et al.*, 1996). Esta aseveración concuerda con la Com. Personal de Pecadores de la Laguna de Termino en Campeche donde indicaron que el máximo pico reproductivo de la especie ocurre en el mes de enero.



## 2.7.- Inducción a la maduración final y al desove en peces teleósteos

Existen especies, que a causa del estrés producido por el cautiverio no se reproducen en estas condiciones, debido a la inhibición de la producción y liberación de las hormonas sexuales estimulantes del desarrollo gonadal y en ocasiones por el mal manejo que se les da a los organismos. Bajo condiciones naturales, se sabe que el ciclo reproductor de los peces se inicia cuando se producen cambios específicos en el medio ambiente. Los factores de tipo exógeno que influyen sobre el ciclo reproductor son: temperatura, fotoperiodo, oxígeno disuelto, pH, salinidad, feromonas, sustrato de desove, lluvias, ciclo lunar, factores sociales (Carbajal, 1997).

El desarrollo gonadal puede ser controlado por la manipulación de los factores ambientales como el fotoperiodo, la temperatura, pH, salinidad, sustrato de desove, ciclo lunar, lluvias, entre otros. Sin embargo, debido a los elevados costos que implica la adaptación y mantenimiento de un sistema que controle estas variables, el más práctico y confiable método de control sobre dicho proceso consiste en el uso de químicos exógenos como hormonas que estimulan el normal desarrollo gonadal (Harvey y Hoar, 1979). Actualmente, la tecnología para producción de crías en Centropómidos se basa fundamentalmente en la captura de peces sexualmente maduros e inducidos al desove a través del método de inyecciones e implantes, hasta el momento no ha sido posible obtener desoves de manera natural en cautiverio. Los resultados han sido promisorios cuando manejo es el adecuado y la alimentación la más cercana a su medio natural. Estudios realizados para inducir la maduración final y desove, usando la hormona gonadotropina coriónica humana (GCH) muestran que esta hormona a dosis de 500 IU/kg de peso produce ovulación, gametos viables y sobrevivencia larval en el robalo blanco; mientras que en reproductores silvestres de *C. parallelus* con tallas de 210 a 1740 g se obtuvo gametos y porcentajes de 70 a 90 % de fertilización a temperaturas de a 25 °C y salinidad de 29 a 35 ups (Neidig *et al.*, 1999; Godinho *et al.*, 2000). Otros estudios usando implantes de cuatro análogos de hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH; salmón (sGnRH), pollo (cGnRH-II), espáridos (sbGnRH) y mamíferos

(mGnRH)) en el robalo blanco con dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  durante cinco días, muestran resultados positivos con mGnRH, sGnRH y cGnRH-II lo cual permiten el éxito en la ovulación (Skapura *et al.*, 1999); en Tabasco, México, los esfuerzos realizados para la obtención de un protocolo de inducción en Centropómidos ha dado resultados positivos al usar el método de implantes e inyecciones; en el primero se obtuvieron desoves en un 100 % de los tratamientos; mientras que al aplicar inyecciones de GnRH-a se incrementó el diámetro de los ovocitos, la autora de este estudio menciona que la dosis de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  fue la mejor al presentar el mayor diámetro de ovocitos después de la inducción (Contreras-García, 2011); sin embargo, Sánchez-Zamora *et al.* (1999), al aplicar implantes de la hormona LHRH- con dosis de 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{animal}$  en robalo blanco mencionan que no hubo respuesta hormonal a la inducción a la maduración ni a los estímulos manuales y que la falta de maduración se debió a que los animales fueron de tallas muy pequeñas y aun no alcanzaban madurez sexual, las dosis empleadas fueron bajas y que pudo deberse a los cambios de salinidad, temperatura generados por la época de lluvias y nortes en la zona de estudio, este mismo autor 10 años después, menciona que al realizar cambios en la dieta y salinidad principalmente, obtienen al menos cuatro hembras maduras y 70 % de machos espermiantes (Sánchez-Zamora *et al.*, 2009). Los resultados más importantes hasta el momento obtenidos con implantes de análogos de GnRH en los robalos, está el estudio de Ibarra-Castro *et al.*, (2011) al usar implantes con dosis de  $121\pm 31 \mu\text{g kg}^{-1}$  en hembras y  $83\pm 6 \mu\text{g kg}^{-1}$  en machos se obtiene un total de 70, 936 juveniles de 45 días post eclosión.

En el caso del robalo prieto, se han realizado algunos ensayos con reproductores silvestres y recientemente con especímenes en cautiverio donde se ha logrado obtener larvas y estas llevadas a la etapa de juvenil, mediante la aplicación de hormonas análogas. Sin embargo, la técnica aun no es del todo precisa, ni se ha corroborado de manera experimental por lo que se requiere profundizar en este sentido y evaluar otros alcances en el desarrollo de un paquete tecnológico adecuado para la especie.

### 3. Justificación

El manejo reproductivo es el primer paso en la elaboración de paquetes tecnológicos en acuicultura. La demanda de alimento a nivel mundial y nacional es cada vez mayor, por lo que, es indispensable integrar nuevas especies que sean viables para la acuicultura. Es por ello, que es importante generar conocimiento que permitan conocer algunos aspectos relevantes sobre técnicas de inducción a la reproducción y control del evento reproductivo en diferentes etapas del ciclo de vida de los organismos. El robalo prieto es una especie que se considera endémica de México la cual, presenta características atractivas para su incorporación como especie potencial a cultivar. Sin embargo, la única fuente de obtención de semilla y reproductores es del medio silvestre, lo que hace inviable mantener esta única fuente del recurso, aunado a ello, los ejemplares que se obtienen del medio silvestre son organismos grandes que generalmente mueren en el proceso de captura, cuarentena y aclimatación.

Dentro de estas últimas técnicas se encuentran la inducción a la maduración final y desove mediante la aplicación de hormonas análogas como la GnRH-a y la inversión sexual en larvas, juveniles o adultos para obtener del sexo deseado a tallas más pequeñas. Este proceso se lleva a cabo empleando hormonas sintéticas como detonadores de la diferenciación sexual y reversión sexual.

En el presente estudio, se pretende contribuir en dos vertientes del manejo reproductivo en cautiverio. 1) la obtención de lotes de hembras viables a temprana edad mediante la inducción de inversión sexual de machos juveniles y adultos a hembras viables, empleando esteroides sintéticos, asimismo, evaluar que el proceso de inversión sexual no regresa a su condición inicial, previo conocimiento, descripción del desarrollo gonádico temprano y la diferenciación sexual y 2) la inducción controlada del desove de hembras feminizadas viables, mediante la aplicación de inyecciones e implantes de GnRH-a.

## 4. Hipótesis de Investigación

El robalo prieto *C. poeyi* es una especie hermafrodita protándrica, de la cual se sabe poco en relación a su biología reproductiva. Existe información que indica que la especie habita ríos y lagunas de agua dulce y únicamente incursiona al mar a desovar, realizando migraciones entre estos ambientes durante la temporada de desove. Durante estos movimientos, la especie es capturada en grandes volúmenes constituyendo una pesquería comercial importante. En el Laboratorio de Acuicultura Tropical se han venido desarrollando estrategias que permitan controlar el desove en cautiverio, aunque aún existen vacíos en la información; sin embargo, la información existente para *C. undecimalis* puede servir de referencia. Para la realización de la presente investigación se plantean las siguientes hipótesis: (1) el proceso de desarrollo gonádico y la diferenciación sexual en *C. poeyi* en cautiverio mantiene características morfológicas y temporalidad similares a la de otros peces teleósteos; (2) para fortalecer el manejo reproductivo en cautiverio, es factible producir poblaciones 100% hembras mediante tratamientos con E2 en diferentes etapas de su ciclo de vida (juvenil temprano, juvenil tardío y adulto), estos organismos revertidos a hembra mantendrán su condición, siendo totalmente funcionales, y (3) las hembras obtenidas mediante reversión sexual inducida responderán a tratamientos con análogos de GnRH-a, alcanzando la maduración gonadal, produciendo ovocitos viables y participando activamente en desoves.

## 5. Objetivos

### Objetivo general

- Evaluar el manejo reproductivo de *C. poeyi*, bajo condiciones de cautiverio, incluyendo aspectos del desarrollo gonádico temprano, la manipulación de la diferenciación y la reversión sexual, la maduración final y el desove.

### Objetivos específicos

- Describir el desarrollo gonádico temprano y la diferenciación sexual de *C. poeyi*.
- Evaluar el efecto de la administración oral de 17- $\beta$  estradiol en el alimento para la inversión sexual de juveniles de *C. poeyi*.
- Inducir la reversión sexual de machos adultos a hembras funcionales de *C. poeyi* mediante la aplicación de implantes con 17-  $\beta$  estradiol.
- Evaluar la efectividad de diferentes dosis de GnRH-a empleando inyecciones e implantes en la inducción de la maduración y desove de *C. poeyi* de hembras tratadas con estradiol.

## 6. Materiales y Métodos

6.1.- La diferenciación gonadal temprana sugiere la existencia de hermafroditismo protándrico en el robalo mexicano *Centropomus poeyi* (Centropomidae, Perciformes, Teleostei).

### 6.1.1.- Obtención de organismos.

Los organismos empleados en la presente investigación fueron obtenidos de desoves controlados llevados a cabo en la Estación de Acuicultura Marina de la División Académica de Ciencias Biológicas de la UJAT, ubicada en Jalapita, Centla, Tabasco. Se emplearon reproductores silvestres de *C. poeyi* capturados en la zona costera del estado de Tabasco y fueron mantenidos en tanques plásticos circulares de 63 m<sup>3</sup> (9 m Ø), con condiciones de calidad de agua óptimas y alimentación a saciedad aparente, mediante el suministro de alimento comercial para peces marinos (Europa®, 55 % de proteína) y trozos de peces forrajeros, principalmente crías de tilapia *Oreochromis niloticus*, topén *Dormitator maculatus* y sardinas de los géneros *Dorosoma* y *Astyanax*.

### 6.1.2.- Obtención de huevos y larvas.

Para la obtención de huevos y larvas viables se utilizó a una hembra y tres machos del lote de reproductores (peso promedio de 5,850 g y 3,328 ± 112 g, respectivamente), los cuales fueron inducidos al desove usando implantes de colesterol hechos a mano con una dosis de 200 µg/pez de LHRHa (Syndel, Western Chemical, Fendale, WA, USA), siendo posteriormente colocados en un tanque circular de fibra de vidrio de 4 m de diámetro con agua marina (salinidad de 30 ppt ± 1.4 y temperatura de 28 ± 1.6 °C). El desove ocurrió el día 05 de octubre de 2014; 27 horas después de la inducción.

### 6.1.3.- Cultivo de larvas y juveniles.

Una vez eclosionadas, las larvas fueron colocadas a una densidad de 200 larvas/L, en tanques circulares de fibra de vidrio de 500 L de capacidad con un recambio de agua del 80% y aireación continua. La salinidad ( $28.9 \pm 1.1$  ppt), oxígeno disuelto ( $6.5 \pm 0.8$  mg/L), y la temperatura ( $27.5 \pm 1.8^{\circ}\text{C}$ ) fueron monitoreadas diariamente. A los 15 dph, la salinidad se disminuyó gradualmente (5 ppt/día) hasta que los peces se encontraran en agua dulce. La alimentación de las larvas consistió en microalgas y mezcla de rotíferos *Brachionus plicatilis* y *B. rotundiformis* (30 org/ml) a 13 dph se agregaron nauplios de artemia (30 org/ml). Las larvas fueron destetadas con alimento comercial (Gemma wean™, Skretting; composición proximal: 62% proteína, 14% lípidos, 8% cenizas, 0.2% fibra), empezando el día 20 ph y continuando hasta los tres meses. Del lote final de organismos juveniles obtenido, se tomaron 700 individuos de manera aleatoria, siendo repartidos equitativamente en tres tanques circulares de 2,000 L conectados a un sistema de recirculación cerrado. Los peces se mantuvieron en este sistema hasta la realización de los muestreos. La alimentación se proporcionó a saciedad aparente cuatro veces al día con alimento comercial marca Europa™, (Skretting; composición proximal: 55% proteína, 15% lípidos, 12% cenizas, 1.0% fibra and 8.5% humedad) de 3.0, 4.0 y 6.0 mm de diámetro. Diariamente, fueron sifonearon los restos de comida, heces y al menos un 10 % de agua del sistema. Los parámetros de temperatura, pH y oxígeno disuelto se midieron diariamente, los nitratos, nitritos y amonio una vez a la semana. El oxígeno disuelto ( $5.92 \pm 0.036$  mgL<sup>-1</sup>) se midió con un oxímetro (YSI 55, California, USA), la temperatura del agua se midió con un termómetro (YSI® 55, California, USA), registrándose valores promedio de  $29.8^{\circ}\text{C} \pm 0.11$ . El pH ( $6.8 \pm 0.04$ ) fue medido con un potenciómetro (Denver Instruments UB-10, Denver, Colorado, USA). Semanalmente, se midieron, con un equipo multiparamétrico (Hanna Instruments, HI 98311, Rhode Island, USA), las concentraciones de amonio ( $0.1 \pm 0.03$  mg L<sup>-1</sup>), nitritos ( $0.01 \pm 0.015$  mg L<sup>-1</sup>) y nitratos ( $0.3 \pm 0.02$  mg L<sup>-1</sup>), respectivamente.

#### **6.1.4.- Recolecta y procesamiento de muestras para histología.**

Semanalmente, se recolectó una muestra de cinco peces, iniciando a partir de los 136 días posteriores a la eclosión (dpe) y hasta el día 185. A partir de esa fecha, la recolecta se realizó cada dos semanas, hasta cumplidos los 367 dpe. Al principio los peces se procesaron completos, una vez que fue posible extraer las gónadas completas de cada organismo, se procesó solamente tejido gonadal. Los peces completos se fijaron por un periodo de 18 a 24 horas, mientras que las gónadas que se extrajeron a peces más grandes se mantuvieron en el fijador por un periodo de 8 a 12 horas, en ambos casos se utilizó una solución de Bouin como fijador. Una vez transcurrido el periodo de fijación estipulado, las muestras se lavaron con agua corriente y se mantuvieron en alcohol etílico al 50% hasta su procesamiento. Para el procesamiento de las muestras se siguieron las técnicas histológicas convencionales, las laminillas obtenidas se tiñeron con una tinción basada en hematoxilina-eosina (H-E) y Tricrómica de Masson (Aguilar *et al.*, 1996).

#### **6.1.5.- Criterios para la clasificación histológica.**

Para analizar las muestras histológicas se empleó un microscopio óptico (Zeiss®, Göttingen, Germany) con los objetivos 10X, 40X y 100X. La descripción histológica de cada una de las preparaciones, se consideraron los criterios de Nakamura *et al.* (1998) con *Oreochromis niloticus*; Devlin y Nagahama (2002) con peces teleósteos; Strüssmann y Nakamura (2002) con *Oncorhynchus rhodurus*; Meijide *et al.* (2005) con *Cichlasoma dimerus* y de algunos trabajos con adultos de *C. undecimalis* por Grier y Taylor (1998), Grier (2000) y Huber *et al.*, (2014) con juveniles de la misma especie. De igual manera, para describir las características morfológicas se siguieron las recomendaciones de Devlin y Nagahama, (2002), Pandian, (2013) y Nishimura y Tanaka, (2014) con peces teleósteos.



## 6.2.- Feminización funcional del robalo mexicano *Centropomus poeyi* utilizando 17- $\beta$ estradiol en la dieta.

Se mantuvieron reproductores silvestres en tanques circulares de 63 m<sup>3</sup> de plástico (9 m  $\varnothing$ ) con 10% de intercambio diario de agua y fotoperiodo natural en la Estación de Acuicultura Marina (MAS -UJAT), de la División de Ciencias Biológicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco ubicada en Jalapita, Centla, Tabasco. En cada evento de desove, una hembra madura y dos machos (peso promedio de 5.550  $\pm$  223 g y 3.000  $\pm$  68 g, respectivamente) fueron inducidos utilizando implantes de colesterol hechos a mano con 200  $\mu$ g por pez de LHRHa (Syndel, Western Chemical, Fendale, WA, EE. UU.) y colocado en un tanque de desove de fibra de vidrio (4 m  $\varnothing$ , 1 m de profundidad). El desove comenzó después de 27 horas; los huevos fertilizados se recogieron usando una malla de malla suave de 400  $\mu$ m. Los embriones se colocaron en tanques de fibra de vidrio de 500 L, y la incubación comenzó 44 horas más tarde. Las larvas se mantuvieron en estos tanques con un intercambio diario de agua del 80% y aireación continua. La salinidad (28.6  $\pm$  1.9 ppt), el oxígeno disuelto (6.6  $\pm$  1.1 mg L<sup>-1</sup>) y la temperatura (27.1  $\pm$  2.5 ° C) se controlaron diariamente. A los 15 dpe la salinidad se redujo gradualmente (5 ppt por día) hasta que los peces estuvieron en agua dulce. Los tanques se llenaron con agua salada y se almacenaron con una mezcla de las microalgas verdes *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis oculata* (2-4x10<sup>5</sup> células/mL). La alimentación con rotíferos se inició con *Brachionus rotundiformis* a una densidad de 20 org / mL, en el día 11 la densidad disminuyó a 15 org / mL y se agregó *B. plicatilis* a una densidad de 15 org / mL haciendo un total de 30 rotíferos/mL hasta el día 22. A los 13 dpe, se añadieron nauplios de Artemia a la mezcla a una densidad de 30 org/mL, hasta el día 22. Las larvas fueron alimentadas con alimento comercial (Gemma wean <sup>TM</sup>, Skretting; composición próxima: 62% de proteína, 14% de lípidos, 8% de ceniza, 0,2% de fibra) a partir de los 20 dpe y continuando durante seis meses. Después de seis meses, los peces fueron alimentados con Europa <sup>TM</sup>, (Skretting, composición próxima: 55% de proteína, 15% de lípido, 12% de ceniza, 1.0% de fibra y 8.5% de humedad).

### **6.2.2.- Obtención de muestras.**

Se llevaron a cabo dos experimentos en el Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Los juveniles se obtuvieron a partir de desove inducido en octubre de 2013 y octubre de 2014. Dado que la producción de alevines de robalo mexicano no es a gran escala, el número de peces en cada réplica fue limitado. 120 y 240 juveniles fueron seleccionados al azar para los experimentos, respectivamente. Las muestras en el experimento (I) fueron 340 días después de la eclosión (dpe) con testículos bien definidos. Para el experimento (II), las muestras tenían 227 dpe y estaban en el proceso de diferenciación sexual a testículos. La condición gonadal se determinó con tinción convencional con hematoxilina-eosina.

### **6.2.3.- Diseño experimental.**

Para evaluar la efectividad de los tratamientos con dosis de E2 en la dieta, se llevaron a cabo experimentos por separado utilizando un diseño completamente aleatorizado con un factor (dosis de E2). Cada experimento consistió en cuatro tratamientos que se realizaron por triplicado. En el primer experimento, se evaluaron tres dosis 40, 50 y 60 mg de E2 kg<sup>-1</sup> de alimento. En el segundo experimento los tratamientos fueron dosis de 10, 20 y 30 mg de E2 kg<sup>-1</sup> de alimento. En ambos experimentos, se incluyó un grupo control (0 mg E2 kg<sup>-1</sup> de alimento). Diez juveniles fueron colocados aleatoriamente en cada unidad experimental para el primer experimento, con una longitud total promedio inicial de 150.2 mm ( $\pm$  1.6) y un peso de 30.1 g ( $\pm$  9.8). Para el segundo experimento, utilizamos 20 juveniles por réplica, con una longitud total promedio inicial de 73.7 mm ( $\pm$  4.5) y un peso de 2.8 g ( $\pm$  0.4). Ambos experimentos se llevaron a cabo en un sistema de recirculación cerrado, que consta de doce tanques circulares de 2.000 L de capacidad. Todos los tanques se llenaron con agua dulce no clorada y se mantuvieron bajo filtración química y mecánica durante el experimento. Se construyó un filtro para eliminar el E2 residual y los sedimentos en el agua usando un tanque de plástico de 200 L (50 cm Ø, altura 100 cm) que contiene tres camas: a) 5 Kg de carbón activado granular (Silva et al.,

2012) contenido en bolsa de malla de mosquito; b) 10 Kg de conchas de ostras trituradas; y c) 10 Kg de grava. El agua se recirculó utilizando una bomba de aspiración Jacuzzi® de 1.5 HP equipada con un filtro de arena, y se instaló en la parte superior de un depósito de 5.000 litros. Los desechos de cada tanque se extraían a diario, y se realizaba un reemplazo del 30% del agua una vez a la semana. Las réplicas del grupo de control se mantuvieron en tanques similares separados del sistema de recirculación.

#### **6.2.4.- Dietas experimentales.**

En ambos experimentos, los peces fueron alimentados con alimento comercial de peces marinos Europa® (55% de proteína) impregnados con las diferentes dosis de E2. Para la preparación del alimento impregnado de la hormona se realizó el método propuesto por Pandian y Sheela (1995), variando las dosis para cada tratamiento. Los alimentos para los grupos de control se impregnaron únicamente con alcohol etílico 96% (usado como vehículo para E2 en los otros tratamientos). Los peces fueron alimentados hasta saciedad aparente a las 8:00, 11:00, 14:00 y 17:00 h, durante un período de 60 días para ambos experimentos.

#### **6.2.5.- Evaluación de crecimiento y supervivencia y análisis histológico.**

Una vez que concluyó el período de exposición de E2, llevamos a cabo tres muestreos (30, 180 y 300 días después del tratamiento) usando un procedimiento similar en ambos experimentos. Al final de cada tratamiento y en los muestreos posteriores, el peso se determinó con una balanza analítica (Ohaus®, Pine Brook, Nueva Jersey, EE. UU.), Con una precisión de 0,001 g, y se midió la longitud total con calibradores vernier digitales (Carbon Fiber Composites Digital® Atlanta, Georgia, EE. UU.), Con una precisión de 0,1 mm. Las mediciones se realizaron en todas las muestras en cada tratamiento. La supervivencia se evaluó contando los peces de cada unidad experimental. Para determinar la proporción de sexos, las submuestras se tomaron aleatoriamente de cada repetición en cada tiempo de muestreo (n = 3, 2 y 1), totalizando 18 por tratamiento en el experimento I y 27 para el experimento II (n = 3, 3 y 3). Un total de 12 peces (experimento I) y 33

(experimento II) por tratamiento se mantuvieron después de la evaluación de la proporción sexual para realizar los ensayos de viabilidad. Los peces muestreados se sacrificaron con una sobredosis de metanosulfonato de tricaina (MS-222; 1g L<sup>-1</sup>). Posteriormente, los peces se disectaron, retirándose las gónadas, las cuales se fijaron por 24 h en solución de Bouin, y se mantuvieron en alcohol etílico al 50%. Las muestras se procesaron y tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) (Aguilar et al., 1996). Brevemente, esta técnica consiste en deshidratar muestras en soluciones alcohólicas consecutivas (50 a 100%), limpiar con xileno e incrustar en parafina, obtener secciones de 5 µm, teñir con H-E y montar las secciones en bálsamo de Canadá. Los portaobjetos se examinaron con un microscopio compuesto (Zeiss®, Göttingen, Alemania) con los objetivos 10X y 40X. El sexo se asignó histológicamente usando los criterios para adultos de *C. undecimalis* de Grier y Taylor, (1998) y Grier (2000); para juveniles de la misma especie reportados por Huber (2014); y para otras especies de peces teleósteos (Nakamura *et al.*, 1998; Devlin y Nagahama, 2002; Strüssmann y Nakamura, 2002; Meijide *et al.*, 2005).

#### **6.2.6.- Maduración y viabilidad de hembras tratadas con E2.**

Los 45 peces restantes de los tratamientos con 50 y 60 mg / kg-1 (24) y del grupo de control fueron trasladados a la estación marina (MAS-UJAT) para pruebas de engorde y desove e implantados con un implante PIT (Avid Identification Systems, Inc., Norco, California, EE. UU.), en la cavidad corporal para su identificación por tratamiento. Las etiquetas PIT fueron insertados usando una aguja hipodérmica de calibre 12 cerca de la aleta pélvica. A los cuatro años de edad, durante la temporada de desove (julio-septiembre), los peces mantenidos para los ensayos de viabilidad reproductiva se anestesiaron con aceite de clavo de olor (0,015 ml L<sup>-1</sup>) para verificar la madurez. Mediante la obtención de muestras de ovocitos y espermatozoides con una cánula de polietileno se verifico el sexo del organismo y el grado de madurez. Las hembras viables fueron aquellas que presentaban ovocitos vitelogénicos y los machos, aquellos que presentaban semen. Se seleccionaron cinco hembras (con peso y talla de 449.46 ± 161.33 g y 37.17 ± 4.47 cm de longitud total) y ovocitos de más de 150 µm de diámetro. Doce machos (con pesos y talla de 317.36 ± 11.36 g

y  $34.50 \pm 3.75$  cm de longitud total) y que presentaban semen. Los peces seleccionados fueron implantados con un implante de celulosa-colesterol hecho a mano en la cavidad corporal, cerca de la aleta pélvica, a una dosis de  $150 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de LHRH. Posteriormente, los peces fueron colocados en un tanque de  $12.5 \text{ m}^3$  donde se presentaron condiciones ambientales de salinidad ( $30.67 \pm 1.67$  ppt), temperatura ( $29.96 \pm 0.86$  ° C), oxígeno disuelto ( $5.98 \pm 0.43 \text{ mg L}^{-1}$ ) y pH ( $8.46 \pm 0.22$ ), estos parámetros se monitorearon tres veces al día. Se realizaron seis ensayos de desove utilizando una hembra y dos machos por ensayo.

#### **6.2.7.- Análisis estadístico.**

Los efectos de diferentes tratamientos de E2 sobre la proporción de sexos, el crecimiento (longitud y peso total) y la tasa de supervivencia se analizaron mediante ANOVA de una vía. Los datos expresados como porcentajes se transformaron con arcoseno antes del ANOVA; sin embargo, las proporciones de sexos se muestran como porcentajes. Se realizó la prueba posthoc de Tukey cuando se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Previamente para todos los casos se verificó la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de la varianza (prueba de Levene). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics Centurion®, v XVI, (nivel de significación  $\alpha < 0,05$ ).

### **6.3.- Reversión sexual de machos adultos funcionales de *Centropomus poeyi* usando implantes de $17\text{-}\beta$ estradiol.**

#### **6.3.1.- Mantenimiento de reproductores y producción de larvas.**

Se mantuvieron reproductores silvestres en tanques circulares de  $63 \text{ m}^3$  de plástico ( $9 \text{ m } \varnothing$ ) con 10% de intercambio diario de agua y fotoperiodo natural en la Estación de Acuicultura Marina (MAS -UJAT), de la División de Ciencias Biológicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco ubicada en Jalapita, Centla, Tabasco. En cada evento de desove, una hembra madura y dos machos (peso promedio de  $5.550 \pm 223 \text{ g}$  y  $3.000 \pm 68 \text{ g}$ , respectivamente) fueron inducidos utilizando implantes

de colesterol hechos a mano con 200 µg por pez de LHRHa (Syndel, Western Chemical, Fendale, WA, EE. UU.) y colocado en un tanque de desove de fibra de vidrio (4 m Ø, 1 m de profundidad). El desove comenzó después de 27 horas; los huevos fertilizados se recogieron usando una malla de malla suave de 400 µm. Los embriones se colocaron en tanques de fibra de vidrio de 500 L, y la incubación comenzó 44 horas más tarde. Las larvas se mantuvieron en estos tanques con un intercambio diario de agua del 80% y aireación continua. La salinidad ( $28.6 \pm 1.9$  ppt), el oxígeno disuelto ( $6.6 \pm 1.1$  mg L<sup>-1</sup>) y la temperatura ( $27.1 \pm 2.5$  ° C) se controlaron diariamente. A los 15 dpe la salinidad se redujo gradualmente (5 ppt por día) hasta que los peces estuvieron en agua dulce. Los tanques se llenaron con agua salada y se mantuvieron con una mezcla de las microalgas verdes *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis oculata* (2-4x10<sup>5</sup> células /mL). La alimentación con rotíferos se inició con *Brachionus rotundiformis* a una densidad de 20 org / mL, en el día 11 la densidad disminuyó a 15 org / mL y se agregó *B. plicatilis* a una densidad de 15 org / mL haciendo un total de 30 rotíferos /mL hasta el día 22. A los 13 dpe, se añadieron nauplios de Artemia a la mezcla a una densidad de 30 org/mL, hasta el día 22. Las larvas fueron alimentadas con alimento comercial (Gemma wean™, Skretting; composición próxima: 62% de proteína, 14% de lípidos, 8% de ceniza, 0,2% de fibra) a partir de los 20 dpe y continuando durante seis meses. Después de seis meses, los peces fueron alimentados con Europa™, (Skretting, composición próxima: 55% de proteína, 15% de lípido, 12% de ceniza, 1.0% de fibra y 8.5% de humedad).

### **6.3.2.- Obtención de muestras.**

Se llevó a cabo un experimento en el Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Los juveniles se obtuvieron a partir de desove inducido en octubre de 2013. Dado que la producción de alevines de robalo mexicano no es a gran escala, el número de peces en cada réplica fue limitado. 60 juveniles fueron seleccionados al azar para el experimento. Las muestras en el experimento con peces de 730 dpe de edad con

testículos bien definidos y organismos espermiantes por presión manual. La condición gonadal se determinó con tinción convencional con hematoxilina-eosina.

### **7.3.3.- Diseño experimental.**

Para evaluar la efectividad de los tratamientos con implantes de E2, se llevó a cabo un experimento utilizando un diseño completamente aleatorizado con de un factor (dosis de E2 en implantes por Kg/pez). El experimento consistió en cuatro tratamientos que se realizaron por triplicado. En Se evaluaron tres dosis 1, 2 y 3 mg de E2 kg<sup>-1</sup> de pez y un grupo control con implantes sin E2. Cinco juveniles fueron colocados aleatoriamente en cada unidad experimental, con una longitud total promedio inicial de 275.7 mm ( $\pm$  2.9) y un peso de 191.2 g ( $\pm$  5.4). El experimento se llevó a cabo en un sistema de recirculación cerrado, que consta de doce tanques circulares de 2.000 L de capacidad. Todos los tanques se llenaron con agua dulce no clorada y se mantuvieron bajo filtración química y mecánica durante el experimento. Se construyó un filtro para eliminar el E2 residual y los sedimentos en el agua usando un tanque de plástico de 200 L (50 cm Ø, altura 100 cm) que contiene tres camas: a) 5 Kg de carbón activado granular (Silva et al., 2012) contenido en bolsa de malla de mosquito; b) 10 Kg de conchas de ostras trituradas; y c) 10 Kg de grava. El agua se recirculó utilizando una bomba de aspiración Jacuzzi® de 1.5 HP equipada con un filtro de arena, y se instaló en la parte superior de un depósito de 5.000 litros. Los desechos de cada tanque se extraían a diario, y se realizaba un reemplazo del 30% del agua una vez a la semana. Las réplicas del grupo de control se mantuvieron en tanques similares separados del sistema de recirculación.

### **6.3.4.- Alimentación de los especímenes y elaboración de implantes.**

En el experimento se usó alimento comercial para peces marinos Europa® (55 % de proteína) y la alimentación de los especímenes fue a saciedad aparente con horarios de 8:00 am, 11:00 am, 14:00 pm y 17:00 pm. Para la elaboración de los implantes que contenían la hormona se siguió la metodología propuesta por Álvarez-Lajonchere y Hernández-Mollejón, (2001), la cual consiste básicamente en

preparar un comprimido a base de colesterol y celulosa en una proporción de 95-100 y añadir la dosis deseada de 17- $\beta$  estradiol.

### **6.3.5.-Evaluación del crecimiento y sobrevivencia.**

Al final los tratamientos, se determinó el peso con una balanza analítica (Ohaus®, Pine Brook, NJ, EE. UU.) con precisión de 0.001 g y la longitud total con un vernier digital (Carbon Fiber Composites Digital® Atlanta, Georgia, USA) con precisión de 0.1 mm. Las biometrías se realizaron a todos los organismos de cada tratamiento. La sobrevivencia se evaluó contando cada uno de los peces de cada unidad experimental.

### **6.3.6.- Calidad del agua.**

Se midió diariamente el oxígeno disuelto, la temperatura y el pH. El oxígeno disuelto se midió con un oxímetro (YSI 55, California, USA), la temperatura del agua se midió con un termómetro (YSI® 55, California, USA). El pH fue medido con un potenciómetro (Denver Instruments UB-10, Denver, Colorado, USA). Semanalmente, se midieron, con un equipo multiparamétrico (Hanna Instruments, HI 98311, Rhode Island, USA), las concentraciones de amonio, nitritos y nitratos.

### **6.3.7.- Análisis estadístico.**

Los efectos de diferentes tratamientos con implantes de E2 sobre la proporción de sexos, el crecimiento (longitud y peso total) y la tasa de supervivencia se analizaron mediante ANOVA de una vía. Los datos expresados como porcentajes se transformaron con arcoseno antes del ANOVA; sin embargo, las proporciones de sexos se muestran como porcentajes. Se realizó la prueba posthoc de Tukey cuando se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Previamente para todos los casos se verificó la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de la varianza (prueba de Levene). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics Centurion®, v XVI, (nivel de significación  $\alpha < 0,05$ ).



## 7. Referencias Bibliográficas

- Aguilar, M.**, Coutiño, B. B. & Salinas, R. P. (1996). Manual General de Técnicas Histológicas e Histoquímicas. Las prensas de ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. D.F. México.
- Álvarez-Lajonchere, L.** y, Hernández Molejón, O. G. (2001). Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 424 p.
- Álvarez-Lajonchere, L.**, Cerqueira, R. V., Diniz, S. I., Araújo, J. y Reis, M. (2004). Primeras bases para una tecnología sostenible de producción de juveniles de robalo chucumite *Centropomus parallelus* Poey. Hidrobiológica, 14 (1): 37-45.
- Allsop, D. J.** (2003). The Evolutionary Ecology of Sex Change. Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy, The University of Edinburgh. 117 Pp.
- Álvarez-Lajonchere, L.**, Cerqueira, R. V., y M. Reis. (2002). Desarrollo embrionario y primeros estudios larvales del robalo chucumite, *Centropomus parallelus* Poey (Pisces, Centropomidae) con interés para su cultivo. Hidrobiológica, 132 (002): 89-99.
- Baroiller, J.F.**, Guiguen, Y. & A. Fostier. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex Differentiation in fish. Cellular Molecular Life Science. 55, 910-931.
- Caballero, V.** (1996). Biología reproductiva del robalo Blanco (*Centropomus undecimalis*) en la zona suroeste del estado de Campeche. CRIP Cd. del Carmen. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (inédito), INAPESCA. Cd. del Carmen, Campeche, México.
- Carvajal RJ.** (1975). Contribución al conocimiento de la biología de los robalos *Centropomus undecimalis* y *C. poeyi* en la Laguna de Términos, Campeche, México. Pesquerías comerciales de la región. Boletín del Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente 14(1): 51-70.
- Carvajal, V. M.** (1997). Inducción a la Maduración y Desove del robalo (*Centropomus nigrescens*) en cautiverio mediante la utilización de las hormonas HCG (Gonadotropina Coriónica Humana) y LHRHa (Luteinizing Hormone

- Releasing Hormone Ethylamide). Tesis profesional. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. 85 Pp.
- Castro-Aguirre, J. L.**, Espinoza-Pérez, H. y Schmitter-Soto, J. J. (1999). Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México. Colección de textos politécnicos. Series biotecnológicas. Noriega-Limusa. Distrito Federal. 711 pp.
- Chang, C. F. & M. F. Lee.** (1992). Involvement of estradiol 17 on the processes of natural and control sex reversal in protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*). Ponencia presentada. Second International Symposium on Fish Endocrinology. St. Malo, France.
- Chávez H.** (1961). Estudio de una nueva especie de robalo del Golfo de México y redescrición de *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Ciencia* 21(2): 75-83.
- Chávez, H. R.** (1963). Contribución al conocimiento de la Biología de los robalos, Chucumite y Constantino (*Centropomus undecimalis*) del Estado de Veracruz, México. *Ciencia* 22 (5): 141-161.
- Chávez, H.** (1981). Marcado de robalo prieto *Centropomus poeyi*, en la cuenca del Papaloapan. *Ciencias Pesquera*, Instituto Nacional de Pesca, Departamento de Pesca, México 1 (1):17-26.
- Cerqueira R. V.** (2002). Cultivo do robalo: aspectos da reprodução, larvicultura e engorda. R.V. Cerqueira (ed.), Universidad Federal de Santa Catarina, Laboratorio de Piscicultura Marina. Florianópolis, Brasil. 94 pp.
- Cerqueira, V. R. & Tsuzuki, M. Y.** (2009). A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiol Biochem* 35:17–28.
- Contreras, G. M. J.** (2011). Inducción de la reproducción en *Centropomus undecimalis* y *Centropomus parallelus* bajo condiciones de cautiverio empleando inyecciones e implantes de GnRH-a. Tesis de Maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División Académica de Ciencias Biológicas. Tabasco, México. 123 Pp.
- Colombo, G. & Grandi, G.** (1990). Gonad sex differentiation of *Anguilla anguilla* by sex steroids. *Int. Rev. Hydrobiol.*, 76, 763-773.
- Devlin, R. H. & Nagahama, Y.** (2002). Sex determination and sex differentiation in

- fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208, 191-364.
- Fuentes, C. D.** (1973). Contribución al conocimiento de la biología del robalo prieto (*Pisces, Centropomus poeyi* Chávez) en el área de Alvarado, Veracruz, México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* XXXIV: 369-421.
- Green, B. W.,** Veverica, K. L. & M. S. Fitzpatrick. (1997). Fry and Fingerling Production. Dynamics of Pond Aquaculture. Boca Raton, Florida, EE.UU.: CRC Press.
- Grier, H. J. & R. G. Taylor.** (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *J. Fish Biol.*, 53, 521-542.
- Grier, H. J.** (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook (*Centropomus undecimalis*) (Teleostei: Centropomidae). *J. Morphol.*, 234, 265-281.
- Ghiselin, M.** (1969). The evolution of hermaphroditism among animals. *Quart. Rev. Biol.*, 44:189-208.
- Godinho, H. M.,** Da Silva-Serralheiro, P. C., De Medeiros-Ferraz, E., Marcondes-Pimentel, C. M., Da Rocha-Oliveira, I. & P. De Paiva. (2000). Reprodução induzida em robalo *Centropomus parallelus* Poey, 1860. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 37 (1): 37-42.
- Gómez, G. A.** (1995). Desarrollo gonadal y sexualidad en peces teleósteos. *Revista Saber*, 7 (2): 7-17.
- Goudie, C. A.,** Redner, B. D., Simco, B. A. & K. B. Davis. (1983). Feminization of channel catfish by oral administration of steroid sex hormones. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112, 670-672.
- Harvey, B.J. y Hoar, W.S.** (1979). Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. 48 Pp.
- Happe, A. & Y. Zohar.** (1988). Self-fertilization in the protandrous hermaphrodite (*Sparus aurata*): development of the technology. Ponencia presentada en: *Reproduction in Fish-Basic and applied aspects in endocrinology and genetics*, Les colloques de l'INRA, INRA, Tel Aviv, Israel.
- Hernández-Vidal, U.** (2002). Identificación del sexo y evaluación de la inducción

- hormonal en el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Monterrey, Nuevo León, México 83 p.
- Huber, C. G.** (2007). Habitat preferences of juvenile common snook in the Lower Rio Grande, Texas. Tesis de maestría no publicada. Texas Tech University. Texas, EE.UU.
- Ibarra-Castro, L.,** Álvarez-Lajonchère, L, Rosas C., Palomino-Albarrán, I. G., Holt, J. G. & A. Sánchez-Zamora. 2011. GnRHa-induced spawning with natural fertilization and pilot-scale juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Aquaculture*. 319:479-483
- Johnstone, R.,** Simpson, T. H. & A. F. Youngson. (1978). Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*. 13, 115-134.
- Nakamura, M.** (1984). Effects of estradiol-17b on gonadal sex differentiation in two species of salmonids, the masu salmon, *Oncorhynchus masou*, and the chum salmon, *O. keta*. *Aquaculture*. 43, 83-90.
- Nakashima Y.,** Kuwamura T. & Y. Yogo (1995) Why be a both-way sex changer? *Ethology* 101: 301–307.
- Neidig, C. L.,** Skapura, D. P, Grier, H. J, & J. M. Sprinkel. (1999). A preliminary study- A comparison of doses of Human Chorionic Gonadotropin (HGC) on ovulation, eggs quality and larval survival in common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch) In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish; 1999 4-9 Jun; Bergen, Norway; p 429.
- Nikolsky GV.** (1963). The ecology of fishes. Academic Press. London. 352 Pp.
- Nelson, J. S.** (2006). Fishes of the World, 4ta. Edition. John Wiley & Sons, Inc. Printed in the United States of America. 601 Pp.
- Marshall, A. R.** (1958). A survey of the snook fishery of Florida, with studies of the biology of the principal species, (*Centropomus undecimalis*) Bloch. Florida State Board Cons. Mar. Res. Lab. Tech., 22, 5-37.
- Loran-Nuñez, R. M.,** Martínez-Isunza, F., Valdez-Guzmán, A.J., Garduño-Dionate, M. y E. R. Martínez-Loran. (2012). Reproducción y madurez sexual de robalo prieto (*Centropomus poeyi*) y robalo blanco (*C. undecimalis*) en el Sistema

- Lagunar de Alvarado, Veracruz (2005-2007). *Ciencia Pesquera*, 20(1): 49-64.
- Omoto, N.**, Maebayashi, M., Mitsunashi, E., Yoshitomi, K. Adachi, S. & K. Yamauchi. (2002). Effects of estradiol-17- $\beta$  and 17- $\alpha$  methyltestosterone sex differentiation in F2 hybrid sturgeon. *Physiology Science*. 68, 1047-1054.
- Pandian, T. J.** & Sheela, S. G. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*. 138, 1-22.
- Pandian, T. J.** (2012). *Sex Determination in Fish*. Taylor & Francis Group, LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL. 283 Pp.
- Patiño, R.** (1995). *Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous Chemical*. Texas Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, Texas. 30 p.
- Patiño, R.**, Davis K. B., Schoore, J. E., Uguz, C., Strüssmann, C. A., Parker, N.C., Simco, B. A. & C. Goudie. (1996). Sex differentiation of Channel Catfish gonads: Normal development and effects of temperature. *The Journal of Experimental Zoology*. 276, 209-218.
- Perera-García M**, Mendoza-García, M. y S Páramo-Delgadillo. 2008. Dinámica reproductiva y poblacional del robalo, *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae), en Barra de San Pedro, Centla, México. *Universidad y Ciencia* 24(1):49-59
- Peters, K. M.**, Matheson, R. E. Jr., & R. G. Taylor. (1998). Reproduction and early life history of common snook, (*Centropomus undecimalis*), (Bloch) in Florida. *Bull. Mar. Sci.*, 63, 509-529.
- Piferrer, F.** (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*. 197, 229-281.
- Piferrer, F.** & E. W. Donaldson. 1989. Gonadal differentiation in Coho Salmon *Oncorhynchus kitch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*. 77, 251- 162.
- Piferrer, F.** & E.W. Donaldson. 1994. Uptake and clearance of exogenous estradiol-17 beta and testosterone during the early development of Coho salmon, (*Oncorhynchus kitch*) including eggs, alevins and fry. *Fish Physiology and*

- Biochemistry. 13, 219-232.
- Rivas, L. R.** (1986). Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*. 3, 579-611.
- Sánchez-Zamora, A.**, García Galano, T., Gómez-Díaz-Duran., L. M. y Suárez Bautista, J. (1999). Cultivo de robalo *Centropomus undecimalis*: Aspectos reproductivos y crecimiento de juveniles. Memorias de la IV Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura. V reproducción y genética. Octubre 1999 Cuernavaca, Morelos, México. 19-21.
- Sánchez-Zamora, A.** (2009). Situación actual de la reproducción del robalo blanco en cautiverio, en la UMDI, Sisal, Yucatán. In: Segundo Simposio Internacional sobre Biología y Cultivo de robalos. Villahermosa, Tabasco, México. Aquafish Collaborative Research Support Program. p26.
- Skapura, D. P.**, Grier, H. J., Neidig, C. L., Sherwood, N. M., Rivier, J. E. & R. G. Taylor. (1999). Induction of ovulation in common snook, *Centropomus undecimalis*, using gonadotropin-releasing hormones. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish; 1999 Jun 4-9; Bergen, Norway; p 430.
- Stewart, A. B.**, Spicer, A. V., Inskeep, E. K. & R. A. Dailey. (2001). Steroid Hormone Enrichment of Artemia Nauplii. *Aquaculture*. 202, 177-181.
- Skapura, D. P.**, Grier, H. J., Neidig, C. L., Sherwood, N. M., Rivier, J. E. y Taylor, R. G. (1999). Induction of ovulation in common snook, *Centropomus undecimalis*, using gonadotropin-releasing hormones. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish; 1999 Jun 4-9; Bergen, Norway; p 430.
- Strüssmann, C. A.**, Takashima, F. & K. Toda. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey (*Odontesthes bonaeriensis*). *Aquaculture*. 139, 31-45.
- Taylor, R. G.**, Grier, H. J. & J. A. Whittington. (1998). Spawning rhythms of common snook in Florida. *Journal of Fish Biology* 53: 502-520.
- Taylor, R. G.**, Whittington, J. A., Grier, H. J. & R. E. Crabtree. (2000). Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus*

*undecimalis*, from the east and west coasts of South Florida. Fish. Bull. 98: 612-624.

**Tringali, M. D.**, & T. M. Bert. (1996). The Genetic stock structure in common snook (*Centropomus undecimalis*). Can. J. Fish. Aquatic Sci., 53, 974-984.

**Trombka, D.** & R. R. Avtalion. (1993). Sex determination in tilapia. Journal of Aquaculture. 45, 26-37.

**Tucker, J. W. Jr.** (1987). Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming. Prog. Fish. Cult. 49, 49-57.

**Tucker, W. J.** & W. S. Campbell. (1988). Spawning season of common snook along the east central Florida coast. Florida Scientist, 51 (1): 2-6.

**Vidal-López, J. M.**, Álvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W. M., Patiño, R., Hernández-Franyutti, A.A., Hernández-Vidal, U. y R. Martínez-García. 2012. Feminización de juveniles del robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch 1792) usando 17- $\beta$ -estradiol. Revista. Ciencias Marinas y Costeras ISSN 1659-455X. Vol. 4: 83-93.

**Yamamoto, T.** (1969). Sex differentiation. En: Hoar, W., y Randall, J. (Eds.) Fish Physiology Vol. III. Academic Press, New York.

# CAPITULO 2:

Early gonadal differentiation in the Mexican snook *Centropomus poeyi*

(Centropomidae, Perciformes, Teleostei) suggests protandric

hermaphroditism

Publicado en:

Marine and Freshwater Behaviour and Physiology Journal

Vidal-López, J. M., Contreras-Sánchez, W. M., Torres-Martínez, A., Hernández-Franyutti, A. A., & Uribe, M. D. C. A. (2018). Early gonadal differentiation in the Mexican snook *Centropomus poeyi* (Centropomidae, Perciformes, Teleostei) suggests protandric hermaphroditism. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 51(6), 327-345.



**Early gonadal differentiation in the Mexican snook *Centropomus poeyi*  
(Centropomidae, Perciformes, Teleostei) suggests protandric hermaphroditism**

Juan Manuel Vidal-López<sup>a</sup>, Wilfrido Miguel Contreras-Sánchez<sup>a\*</sup>, Aarón Torres-Martínez<sup>a</sup>,  
Arlette Amalia Hernández-Franyutti<sup>a</sup> and María del Carmen Uribe-Aranzábal

<sup>a</sup>División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco;  
Carretera Villahermosa-Cárdenas Km. 0.5 S/N, Entronque a Bosques de Saloya, CP 86039,  
Tabasco.

ORCID ID [orcid.org/0000-0001-5157-5224](https://orcid.org/0000-0001-5157-5224). Email: [jam\\_vl1@hotmail.com](mailto:jam_vl1@hotmail.com)

ORCID ID [orcid.org/0000-0001-8072-2182](https://orcid.org/0000-0001-8072-2182). Email: [contrerw@hotmail.com](mailto:contrerw@hotmail.com)

ORCID ID [orcid.org/0000-0002-1407-9851](https://orcid.org/0000-0002-1407-9851). Email: [torresmartinezar@hotmail.com](mailto:torresmartinezar@hotmail.com)

ORCID ID [orcid.org/0000-0002-5242-2841](https://orcid.org/0000-0002-5242-2841). Email: [arhefr@hotmail.com](mailto:arhefr@hotmail.com)

<sup>b</sup>Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal, Departamento de Biología Comparada  
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México,  
México.

ORCID ID [orcid.org/0000-0001-8819-0600](https://orcid.org/0000-0001-8819-0600). Email: [mari3uribe3@gmail.com](mailto:mari3uribe3@gmail.com)

\*Corresponding author: División Académica de Ciencias Biológicas. Km 0.5, Carretera  
Villahermosa-Cárdenas, Entronque a Bosques de Saloya. Villahermosa, Centro, Tabasco.  
CP 86039. Tel. 52 (993) 358 1500 ext. 6425. Email address: [contrerw@hotmail.com](mailto:contrerw@hotmail.com)

## **Abstract**

This study describes for the first time the early gonadal morphogenesis and raises the possibility of occurrence of protandric hermaphroditism in the Mexican snook (*Centropomus poeyi*). To achieve this, histological analysis of early gonadal differentiation was performed in 105 juvenile specimens ranging from 136 to 367 days post-hatching (dph). The early gonadal differentiation of the Mexican snook started at 178-213 dph and was completed at 355-367 dph. The sequence of events observed during the gonadal morphogenesis of this species included: the migration of primordial germ cells (PGCs) to the gonadal primordia, the quiescent behavior of PGCs after their establishment, development of the efferent duct system in the hilar region of the gonad, extensive proliferation of germ cells in the germinal region of the gonad followed by the formation of germline nests, differentiation of Aspermatogonia from gonial cells inside the germinal nests, and the morphogenesis of seminiferous lobules. Active spermatogenesis was observed at 355-367 dph, once the compartmentalization of testis in germinal and interstitial compartments was accomplished. Our study demonstrates that in the Mexican snook gonadal differentiation is directed to produce 100% males, implying protandric hermaphroditism and showed the presence of a long-lasting period of gonadal differentiation, which makes this species highly sensitive to environmental cues. **Keywords:** Mexican snook, gonadal differentiation, protandric hermaphroditism, histology

## **Introduction**

Fish have evolved a great variety of sexual strategies, their sexual differentiation patterns are categorized as gonochoristic and hermaphroditic (Smith and Wootton 2015). Gonochoristic fish remain as males or females through their lifespan. Hermaphroditic fish, on the other hand, can change their sex at some point in its life history (Kuwamura and Nakashima 1998;

Guerrero-Estévez and Moreno-Mendoza 2010; Kobayashi et al. 2013). Hermaphroditism may be simultaneous, sequential or serial (Avisé and Mank 2008). Simultaneous hermaphrodites possess both, testicular and ovarian tissues, forming part of the same gonad. Sequential hermaphrodites, on the other hand, possess only one germinal tissue at a time, and they initially mature as either males (protandric) or females (protogynous), and subsequently change their sex as adults in presence of an environmental trigger (Kuwamura and Nakashima 1998; Devlin and Nagahama 2002). Serial hermaphroditic species, such as the Okinawan Rubble Goobid (*Trimma okinawae*) are able to change their sex in a bi-directional way (Nakazono and Kuwamura, 1987; Nakamura et al. 2006).

Functional hermaphroditism in fish has been documented in around 500 species belonging to 20 families and nine orders (Avisé and Mank 2008). However, a meta-analysis performed by Sadovy de Mitcheson and Liu (2008) showed that only 137 of the species described in the literature as hermaphroditic can be considered as such, while the evidence available for the rest of species is still insufficient. Many of these species are clearly not normally or functional hermaphroditic (Sadovy and Shapiro 1987). Functional hermaphroditism occurs in the orders Anguilliformes, Stomiiformes, Aulopiformes, Cyprinodontiformes, Synbranchiformes, Scorpaeniformes and Perciformes (Pandian 2012). Within the order Perciformes, the Centropomidae family consists of 12 species, all of which are considered to be protandric hermaphrodites (Blaber 1997). Protandry in fish is a rare condition compared with protogyny, probably due to selective pressures (Avisé and Mank 2008). Within the Centropomidae family, this condition has only been demonstrated in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Grier and Taylor 1998; Taylor et al. 2000) and the blackfin snook, *Centropomus medius* (Maldonado-García et al. 2005), while the occurrence of this condition in other species of the family remains speculative.

The Mexican snook is an endemic centropomid species inhabiting rivers and coastal regions of the Gulf of Mexico, from Tamaulipas state to Campeche in Mexico, possessing the narrowest range of distribution of any centropomid (Chávez 1961, 1963). This species is the second largest snook in the Atlantic Ocean, reaching a maximum total length of 90 cm (Chávez 1961; Chávez-Caballero et al. 2014). Even though the Mexican snook supports an artisanal fishery in the Gulf of Mexico (Álvarez-Lajonchère and Tsuzuki 2008), the species has been studied less than other centropomids such as the common snook or the fat snook. However, some studies provided information of this species regarding feeding habits and growth rate (Fuentes 1973), sexual maturity and reproductive cycle of wild adults (Lorán-Núñez et al. 2012) and more recently, the embryonic development was described (Kubicek et al. 2018). In general, the species reproduces from June to September, though some populations have an extended reproductive period (Chávez-Caballero et al. 2014). As the rest of centropomids, the Mexican snook is assumed to be a protandric hermaphrodite (Álvarez-Lajonchère and Tsuzuki 2008), but whether the species present this condition or not, has not yet been confirmed morphologically.

The study of gonadal morphogenesis in hermaphrodite fish is important to improve our understanding of the evolutionary origins of sexual lability (Avisé and Mank 2008). Hermaphrodite fish are also ideal models to investigate sexual differentiation because gonadal differentiation occurs during sexual change in adult organisms (Kobayashi et al. 2013). In addition, characterization of gonadal morphogenesis is necessary to determine the period of major sexual lability (usually the period of undifferentiated gonad) when gonads are more sensitive to environmental factors such as hormones, temperature, pH or social cues (Beardmore et al. 2001; Devlin and Nagahama 2002). During this period, gonadal development can be manipulated to produce monosexual stocks for aquaculture purposes

(Strüssmann et al. 1996; Passini et al. 2014; Contreras-García et al. 2017). Furthermore, in ecotoxicological studies, the characterization of gonadal differentiation is important to evaluate the effect of exposure to endocrine disruptors (Rasmussen et al. 2006). This study provides a detailed characterization of the gonadal morphogenesis of the Mexican snook. This information will be valuable not only to improve our understanding on the origin and evolution of hermaphroditism in fish but also for the implementation of management strategies that allow the sex manipulation of this species in captivity. The latter is of special importance, since according to Chávez-Caballero et al. (2014) this species is currently being submitted to a high fishing pressure.

## **Materials and Methods**

**Spawning induction.** All organisms used in this study were obtained from the Marine Aquaculture Station from Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, located in the municipality of Centla, Tabasco, Mexico. Fish for this study were obtained from an induced spawning carried out in a wild-caught broodstock set maintained under constant photoperiod (12:12 h light/darkness) and subjected to weekly water exchanges of 10%. One mature female and two males with a mean weight of 5,850 g and  $3,328 \pm 112$  g, respectively, were used. Spawning was induced using cholesterol implants of 200  $\mu$ g LHRHa (Syndel, Western Chemical, Fendale, WA, USA). After hormonal implantation, fish were transferred to a fiberglass spawning tank of 4 m  $\varnothing$  and 1 m depth. Mean salinity was maintained at  $30 \pm 1.4$  parts per thousand (ppt) and temperature at  $28 \pm 1.6$  °C. The spawning took place 27 h after the application of the hormonal implants.

**Larvae and juvenile rearing.** Fertilized eggs were collected from the spawning tank with a soft mesh of 400  $\mu$ m net opening. Hatching started 44 h after hormonal induction and embryos were transferred into two fiberglass 500 L-tanks. Larvae were maintained at a

density of 200 individuals per L, under continuous aeration and subjected to a daily water exchange of 80%. Salinity, dissolved oxygen (DO) and temperature were registered daily, presenting mean values of  $28.9 \pm 1.1$  ppt,  $6.5 \pm 0.8$  mg L<sup>-1</sup> and  $27.5 \pm 1.8^\circ\text{C}$ , respectively.

Starting from 15 days post-hatching (dph), salinity was gradually reduced (5 ppt per day), until larvae were transferred to freshwater tanks. These tanks were previously seeded with green microalga and a mix of the rotifers *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformes* (30 org. mL<sup>-1</sup>). At 13 dph, larvae were fed with *Artemia* nauplii (30 org. mL<sup>-1</sup>), but they were changed to commercial food at 20 dph (Gemma wean™, Skretting, proximate composition 62% protein, 14% lipids, 8% ash and 0.2% fiber).

At 60 days of age, seven hundred juveniles were randomly selected and distributed into three tanks of 2,300 L each one (2.0 m Ø and 0.8 m depth) containing chlorine-free freshwater and interconnected by a recirculation system. Water was pumped by a suction bomb Jacuzzi® de 1.5 HP containing a sand filter and connected to a 5,000 L freshwater reservoir. Each tank was daily syphoned and 30% and subjected to weekly water exchanges. Juveniles were maintained in these rearing tanks until the completion of the study. They were fed with pelleted Europa™ food (Skretting; proximate composition: 55% protein 15% lipid, 12% ash, 1.0% fiber and 8.5% humidity) ad libium, four times a day. The size of the food pellet was changed as fish grew.

Dissolved Oxygen was measured using an oximeter YSI 55, (California, USA), temperature was recorded with a thermometer YSI® 55 (California, USA) and pH measured with a potentiometer UB-10 (Denver Instruments, Denver, Colorado, USA). Recorded mean values were  $5.92 \pm 0.036$  mgL<sup>-1</sup> for DO,  $29.8^\circ\text{C} \pm 0.11$  for temperature and  $6.8 \pm 0.04$  for pH. The amount of ammonia, nitrate and nitrite was registered weekly, using a multi-parametric equipment HI 98311 (Hanna Instruments, Rhode Island, USA). Mean values for these

parameters were  $0.1 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$  for ammonia,  $0.01 \pm 0.015 \text{ mg L}^{-1}$  for nitrites and  $0.3 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$  for nitrates. After the completion of sampling activities, 50 organisms were maintained in a rearing tank ( $28 \text{ m}^3$ ) for two more years to test some reproductive parameters once they had reached sexual maturity.

***Sampling and histological procedures.*** Fish samplings were carried out weekly ( $n=5$ ), from 136 to 185 dph, after which samplings were carried out every two weeks, until 367 dph. A final sampling was performed when the fish were 15 months old (450 dph) to verify gonadal fate. The total length and weight of each fish was registered. Due to their small size, fish belonging to 136-185 dph were fixed complete in Bouin fixative. From 199 dph onwards, gonads were extracted through an abdominal incision and immediately fixed. All samples were washed with tap water, dehydrated in growing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 80, 96 and 99%), cleared in xylene and embedded in Paraplast<sup>®</sup> (Leica Biosystems, St. Louis, USA). Then, samples were sectioned at seven  $\mu\text{m}$  thick, using a sliding microtome Reichert-Jung Model I (Reichert Jung, Vienna, Austria). The histological sections were stained with hematoxylin-eosin, according to the recommendations of Aguilar et al. (1996).

***Histological analysis and testicular development staging.*** Histological preparations were examined using a light microscope Zeiss Axiostar Plus (Zeiss<sup>®</sup>, Göttingen, Germany), coupled to a digital camera Zeiss AxioCam MRc5. In addition, cellular and nuclear diameters of germ cells corresponding to each developmental stage were determined, using the digital imaging software ZEN (Zeiss Efficient Navigation; Zeiss<sup>®</sup>, Göttingen, Germany). For a better characterization, the testicular morphogenesis of the Mexican snook was classified into five Stages: i) Gonadal Primordium and Undifferentiated Gonad, ii) Early Testicular Differentiation, iii) Intermediate Testicular Differentiation, iv) Late Testicular Differentiation and v) Full Testicular Differentiation. Each stage was defined according to

the main developmental events that have been found to be conserved across the different orders of teleosts fish (Patiño and Takashima 1995; Devlin and Nagahama 2002; Strüssmann and Nakamura 2002; Nakamura 2013). All the histological material was deposited in the histological collection of the Laboratory of Tropical Aquaculture, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

## Results

Three hundred and fifteen histological preparations (3 slides per fish) corresponding to 105 juveniles of Mexican snook were analyzed. The initial (136 dph) mean total length and mean weight of fish was  $45.62 \pm 3.91$  mm and  $1.24 \pm 0.24$  g respectively, while final (367 dph) mean total length and mean weight was  $189.18 \pm 2.25$  mm and  $44.70 \pm 1.74$  g, respectively. From the 105 specimens sampled, 30 presented undifferentiated gonads (29%) and 75 showed gonads with clear signs of testicular differentiation (71%). No signs of ovarian morphogenesis or intersexual conditions were observed in any of the fish analyzed in this study. According to our results, all organisms start their lifecycle as males, with testes being developed directly from the undifferentiated gonad. A very distinctive cellular arrangement was identified in the gonads of the presumptive males of *C. poeyi*. The undifferentiated gonads present two distinctive zones: a germinal compartment located in the ventral region of the gonad and a hilar region consisting mainly of connective tissue and located in the dorsal zone. During the testicular morphogenesis of the Mexican snook, five developmental stages were identified, all of which are described below.

***Gonadal Primordium and Undifferentiated Gonad (up to 171 dph)***. Fish (n=30) had a mean total length of  $59.73 \pm 8.88$  mm and a mean weight of  $1.93 \pm 0.52$  g. At the macroscopical level, these organisms presented undifferentiated gonads adhered to the abdominal wall and distributed cephalocaudally through the peritoneal cavity (Fig. 1A). Gonads had a mean



length of  $51.00 \pm 2.22 \mu\text{m}$  and a mean diameter of  $30.80 \pm 1.56 \mu\text{m}$ . Histologically, the gonadal primordium consisted of a thickened epithelium located immediately under the kidneys, suspended to the abdominal wall through the gonadal mesentery, also called mesogonium (Fig. 1B). During this stage, Primordial Germ Cells (PGCs) were observed migrating from the peritoneal wall through the gonadal mesentery, towards the gonadal primordia (Fig. 1C). PGCs were characterized by being eosinophilic spherical cells with a mean cellular diameter of  $6.85 \pm 0.52 \mu\text{m}$  ( $n=30$ ) and a round nucleus with a mean diameter of  $3.14 \pm 1.02 \mu\text{m}$  ( $n=30$ ) containing scattered chromatin lumps and one notorious nucleolus. The establishment of PGCs in the gonadal primordia marked the Gonadal Primordium and Undifferentiated Gonad Stage, when the discernment of developmental fate of the gonad was not possible. Once in the gonadal primordia, PGCs appeared immersed in connective tissue and surrounded by scarce somatic cells (Fig. 1C, D).

***Early Testicular Differentiation (178-213 dph).*** Fish ( $n=20$ ) had a mean total length of  $70.95 \pm 3.94 \text{ mm}$  and a mean weight of  $3.44 \pm 0.87 \text{ g}$ . The main sign of testicular differentiation was the establishment of the PGCs only in the ventral region of the gonad. This event preceded the appearance of the efferent duct anlagen as narrow spaces located in the interstitial tissue (Fig. 1F). These structures will subsequently grow and fuse to give rise to the efferent duct system in the gonad. At this stage, blood capillaries were developed in the anterior region of the gonad, near from the gonadal mesentery. In the connective tissue of the gonad, an active proliferation of somatic cells was observed, which resulted in the formation of stromatic aggregations (Fig. 1F). PGCs, on the other hand, remained inactive, surrounded by somatic cells.

***Intermediate Testicular Differentiation (227-255 dph).*** Fish ( $n=15$ ) had a mean length of  $109.38 \pm 6.25 \text{ mm}$  and a mean weight of  $8.36 \text{ g} \pm 1.83 \text{ g}$ . During this stage, two distinctive

regions were established in the developing gonad: a germinal and a hilar region. In the ventral portion of the presumptive testis, a germinal compartment containing numerous germ cells associated with somatic cells was identified, while in the dorsal portion of the gonad a hilar region containing abundant connective tissue was observed (Fig. 1G). Both regions were clearly distinguishable from one another by their differential staining affinities. The germinal region was more basophil than the hilar one, owing to the high density of germ cells whose nuclei showed more affinity by hematoxylin (Fig. 1H). The occurrence of blood vessels and efferent duct anlagen was restricted to the hilar region, more eosinophil due to the presence of connective tissue (Fig. 1H). Efferent duct anlagen increased in size, compared with the previous stage. Germ cells in the germinal region of the gonad showed high proliferative activity that resulted in the formation of germline nests, where the first A-spermatogonia started to differentiate (Fig. 2A). A-Spermatogonia were clearly distinguishable from the previous gonial cells in that were larger and their nuclear envelope exhibited numerous indentations (Figure A, inset). A-spermatogonia appeared surrounded by groups of somatic cells that we consider to be pre-Sertoli cells, the undifferentiated precursors of Sertoli cells. The number of germ cells per germinal nest was approximately six.

***Late Testicular Differentiation (269-339 dph).*** Fish (n=30) had a mean length of  $163.40 \pm 16.08$  mm and a mean weight of  $23.52 \pm 6.60$  g. Efferent duct anlagen fused together to form a completely differentiated efferent duct (Fig. 2B, C). Large blood vessels were observed in the hilar region of the gonad (Fig. 2C). A-spermatogonia continued to proliferate inside the germline nests, giving rise to B-spermatogonia, which presented ovoid morphology and a more condensed heterochromatic nucleus (Fig. 2D, E). These B-spermatogonia started to be surrounded by pre-the Sertoli cells associated to the germline nests (Fig. 2D, E) to give rise to the first primordial spermatocysts, the structural unity of spermatogenesis in fish. As a

result of the strong proliferative activity of spermatogonia in the germinal region of the developing testis, germinal nests started to extend towards the already differentiated efferent duct, forming the first seminiferous lobules (Fig. 2F, G). This process was accompanied by the infiltration of connective tissue from the hilar region toward the germinal region of the gonad (Fig. 3A, B). Testicular vasculature continued to develop at this stage.

***Complete Testicular Differentiation (355-367 dph).*** Fish (n=10) had a mean length of  $185.64 \pm 4.13$  mm and a mean weight of  $42.54 \pm 2.69$  g. Testicular differentiation was considered complete when testes showed spermatogenic activity in the seminiferous lobules, evidenced by the presence of spermatogenic cells. All the organisms sampled in this stage showed fully developed testes with spermatocysts containing primary spermatocytes, which were identified based on their nuclear characteristics (Fig. 3C). Fully developed testes had a mean length and weight of  $60.72 \pm 0.15$  mm and  $37.37 \pm 1.98$  mg, respectively.

***Testicular Maturation and viability.*** At 15 months of age, all sampled fish presented advanced spermatogenesis (Fig. 3D-F). Three years after hatching, the reproductive condition of 30 specimens was tested through ventral pressure and cannulation of the gonads. One hundred percent of these organisms were identified as sexually competent males containing fluid and viable sperm. The fish weighed in average  $875.98 \pm 29.56$  g. These organisms were used in different spawning trials, from which fertilized eggs and viable larvae were obtained.

## **Discussion**

This study described the process of early gonadal morphogenesis in the Mexican snook. Additionally, the age and size at what early gonadal differentiation occurs was documented, providing useful information for sex manipulation by exogenous steroid treatments. All the specimens beyond the Gonadal primordium and Undifferentiated Gonad Stage were

differentiating or became differentiated as males, while no signs of ovarian differentiation or intersexual conditions were observed in any of the gonads of the examined specimens. These findings suggest the presence protandric hermaphroditism in this species.

Similar to other protandric hermaphrodites belonging to the order Perciformes, ovarian differentiation in the Mexican snook may occur only after organisms have reached sexual maturity. This process probably requires the degeneration of testicular tissues followed by the biogenesis of ovarian tissues. This was found to be the case in the close related protandric hermaphrodites; the common snook and the barramundi (*Lates calcarifer*), where the transition from male to female is marked by the degeneration of testicular tissues followed by the development of ovarian tissues in the ventral region of seminiferous lobules (Grier and Taylor 1998; Taylor et al. 2000). This condition has been also documented in specimens of the blackfin snook maintained under captive conditions (Maldonado-García et al. 2005).

According to observations performed by our research group on specimens maintained in the Marine Aquaculture Station under hatchery conditions, marked adult specimens that are routinely used as male breeders in procedures of induced spawning can change their sex from one reproductive event to the next (Contreras-García, *pers. com.*). This observational information, taken together with the morphological characterization of the early gonadal differentiation, demonstrate that the Mexican snook starts its lifecycle as male, presenting only testicular tissues with no intersexual conditions during early gonadal morphogenesis.

Under captive conditions, the early gonadal differentiation of the Mexican snook is a long-lasting process that takes around six months and occurs in organisms ranging from five to ten months old. Comparative studies have shown that the period of undifferentiated gonad can last for days, months or even years, depending on the species (Strüssmann and Nakamura 2002). In many teleost species, this period is known by being highly sensitive to

environmental factors such as temperature and synthetic steroids, factors that are routinely used in aquaculture to change sexual ratios (Nakamura et al. 1998; Strüssmann and Nakamura 2002; Nakamura 2013). Though it has been generally described in the literature that fish are susceptible to environmental factors only during the undifferentiated gonad stage, experiments with exogenous steroids have shown that fish can be even sensitive after the onset of gonadal development, which can lead to full or partial sexual reversion (Nakamura 2013). High sensitivity of gonadal differentiation makes fish more vulnerable to the effect of aquatic pollutants such as endocrine disruptors (Rasmussen et al. 2006), with this susceptibility been more severe for species with long lasting gonadal differentiation periods. This is the case of the Mexican snook, where gonadal morphogenesis lasts approximately six months. Fishes present large differences in gonadal developmental rates, Devlin and Nagahama (2002) pointed out that the occurrence of the labile stage differs among species since they present different chronological times of development.

The susceptibility to exogenous steroids or endocrine disruptors during gonadal development of fish may be linked to an early role of endogenous steroids guiding gonadal fate. In a recent study, Vizziano-Cantonnet *et al.* (2016) proposed that the up-regulation of steroid-synthesizing enzymes and the expression of the androgen receptor gene during gonadal development of the Siberian sturgeon, suggests that steroids are relevant for both male and female gonadal development. However, more research is needed in this area to identify the timing of appearance and roles of endogenous steroids during gonadal development.

In this study, testicular differentiation of the Mexican snook was classified into five Stages: i) Gonadal Primordium and Undifferentiated Gonad (136-171 dph); ii) Early Testicular Differentiation (178-213 dph); iii) Intermediate Testicular Differentiation (227-255 dph); iv) Late Testicular Differentiation (269-339 dph); and v) Complete Testicular Differentiation

(355-367 dph). These stages included the establishment of PGCs in the ventral region of the gonad followed by a period of quiescence of these cells, the proliferation of somatic cells, the appearance of efferent duct anlagen, the formation of germline nests and the morphogenesis of seminiferous lobules: Many of these morphological events have been extensively documented in the literature (Patiño and Takashima 1995; Nakamura et al 1998; Strüssmann and Nakamura 2002; Grier and Uribe 2009, Nakamura 2013, Uribe et al. 2015). The developmental events observed in the Mexican snook were common to other teleost species, regardless the order or the family (Nakamura and Nagahama 1989; Gamo 1961; Parmentier and Timmermans 1985; Kobayashi and Suzuki 1990; Foyle 1993; Strüssmann et al. 1996; Higashino et al. 2002; Maack and Segner 2003, Miura et al. 2008; Cho et al. 2014). Even viviparous species such as the eelpout (*Zoarces viviparus*) (Rasmussen et al. 2006) and the barred splitfin (*Chapalichthys encaustus*) (Guerrero-Estévez and Moreno-Mendoza 2012) possess a similar process of testicular development.

The grade of activity of PGCs has been widely used as a criterion to determine gonadal fate in teleost fish, due to the dimorphic proliferation pattern presented by these cells. Our observations of the testicular morphogenesis of the Mexican snook agree with other studies where the migration of PGCs towards gonadal primordium marks the establishment of the Gonadal Primordium and Undifferentiated Gonadal Stage, when it is not possible to identify the sexual fate of the gonads (Patiño and Takashima 1995). In the Mexican snook, the Gonadal primordium and Undifferentiated Gonadal Stage was observed up to day 171 post hatch. In all teleost species studied up to date, gonadal primordium is integrated by both PGCs and somatic cells. In contrast with other vertebrates where a substantial part of gonadal somatic cells has mesodermal origin, all the somatic elements of the fish gonadal primordium derive from the coelomic epithelium, meaning that they have a single embryonic origin

(Hoar and Randall 1969; Nishimura and Tanaka 2014; Smith and Wootton 2015). However, despite this single origin, a study carried out by Nakamura et al. (2006) demonstrated that somatic precursors of the undifferentiated gonad of the Japanese medaka are integrated by two distinctively different cell populations, one expressing *ftz-f1* and adjacently located to PGCs and another expressing *sox9b* and located more dorsally.

Migration of PGCs in the Mexican snook occurred around 136 dph, when these cells were observed either migrating from the peritoneal wall through the gonadal mesentery or established in the gonadal primordium. In other teleost species, e.g. the yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*) and the Ussuri catfish (*Tachysurus ussuriensis*), PGCs migration occurs early, at 3 and 15 dph, respectively (Park et al. 2004; Pan et al. 2017). As in other vertebrates, fish PGCs have an extragonadal origin, so they must migrate towards the gonadal primordium guided by chemotactic agents (Braat et al. 1999). After the colonization of the gonadal primordium, the PGCs of the Mexican snook remained quiescent until approximately day 213 post hatch, surrounded by somatic cells. There is a general agreement among researchers that the proliferative activity of PGCs is a clear dimorphic indicator of gonadal differentiation: ovarian differentiation is characterized by an intensive PGCs proliferation immediately after the colonization of gonadal primordium (Patiño and Takashima 1995; Strüssmann and Nakamura 2002; Guerrero-Estévez and Moreno-Mendoza 2010) while in testicular differentiation PGCs remain quiescent for longer periods, and only the somatic component of the undifferentiated gonad shows intensive proliferation (Nakamura et al. 1998; Murata et al. 2009). In addition, testes remain histologically undifferentiated longer than ovaries in several species of gonochoristic fish (Patiño and Takashima 1995). Some authors have pointed out that germ cell behavior should be used as the main clue in deciding gonadal sex, while somatic changes should be taken into account

only in species where changes in germ cells occur at a considerably later period of testicular development (Meijide *et al.* 2005). Quiescence of PGCs was observed during the Gonadal Primordium and Undifferentiated Gonad Stage of the Mexican snook, when no intensive proliferation of germ cells was observed. The dimorphic proliferation of germ cells has been described in several fish species such as the Nile tilapia (Nakamura and Nagahama 1985), the neotropical cichlid *Cichlasoma dimerus* (Meijide *et al.* 2005), the Coho salmon (Foyle 1993), the pejerrey (Strüssmann *et al.* 1996), the vimba bream (Hliwa *et al.* 2003), the Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) (Van Eenennaam and Doroshov 1998) and the channel catfish (Patiño *et al.* 1996), to give some examples. Intensive germ cell proliferation in females and males of Nile tilapia occurs at days 35 and 70, respectively (Nakamura and Nagahama 1985), while in the pejerrey this event takes place at 98-119 and 49 dph in males and females, respectively (Strüssmann *et al.* 1996).

In the Mexican snook, the onset of gonadal differentiation (termed herein as Early Testicular Differentiation), occurred between 227 and 255 dph. This stage was marked by the appearance of narrow spaces in the connective tissue (efferent duct anlagen), which subsequently gave rise to the efferent duct, whose development was completed between 269 and 339 dph, in the Late Testicular Differentiation Stage. In comparison, in the chum salmon (*Oncorhynchus keta*), the neotropical cichlid (Meijide *et al.* 2005) and the white-spotted char (Nakamura 2013) the efferent duct anlagen first appeared at 45, 72 and 131 dph, respectively. In the Mozambique tilapia, the pejerrey, as well as in many other teleost species, this was considered to be the earliest indicator of testicular development (Nakamura and Takahashi *et al.* 1973; Strüssmann *et al.* 1996). Only in the viviparous barred splitfin the biogenesis of the efferent duct was considered as of secondary importance (Guerrero-Estévez and Moreno-Mendoza 2012). In contrast with ovarian morphogenesis, where the formation of the ovarian



lumen takes place through different developmental mechanisms (Lombardi 1998), the pattern of differentiation of the efferent duct seems to be conserved across different groups of fish. Apparently, in all fish species studied to date this structure develops from narrow spaces in the gonadal stroma (Nakamura *et al.* 1998; Strüssmann and Nakamura 2002).

In contrast with the quiescent behavior of germ cells during the earliest stages of testicular morphogenesis of teleost fish, the somatic element shows intensive proliferation, forming groups of somatic cells called stromatic aggregations. This event has been described in many teleost species such as the whitespotted char (Nakamura 2013), the Japanese medaka, the Malabar grouper (Murata *et al.* 2009) and all the poeciliid species studied to date (Strüssmann and Nakamura 2002; Koya *et al.* 2003). The Ussuri catfish (*Tachysurus ussuriensis*) also shows increased proliferation of somatic cells at 36 dph, and this process is accompanied by the development of vasculature (Pan *et al.* 2017). In the guppy (*Poecilia reticulata*), a study showed that sex inversion induced by androgens can only be achieved when these stromatic aggregations are formed (Dildine 1936). Some authors have suggested that these aggregations of somatic cells differentiate into the sperm duct and components of the interstitial compartment (Koya *et al.* 2003; Nakamura 2013), in such a way that they operate as an organizational center for testicular differentiation.

We observed during the Early Testicular Differentiation a very distinctive morphological pattern of development in the presumptive testis of the Mexican snook. The gonad was clearly regionalized into two zones: a germinal compartment located in the ventral portion of the gonad and characterized by intensive proliferation of germ cells, and a hilar region consisting mainly of connective tissue and dispersed blood vessels, located in the dorsal portion of the gonad. The ventral distribution of germ cells coincides with the patterns described by Mazzone *et al.* (2014), who pointed out that in presumptive male representatives

of the Acanthopterygii, the germ cells accumulate at the ventral periphery of the undifferentiated gonad, while most somatic cells are organized in layers in the dorsal region. This organizational pattern of the primordial germ cells is considered to be the first morphological signal of gonadal differentiation in male and female fish, even prior to the appearance of the testicular duct or the ovarian cavity, and confirmed by the expression of genes linked to sexual differentiation (Mazonni et al. 2014; Vizziano-Cantonnet et al. 2014). The Full Testicular Differentiation stage of the Mexican snook showed spermatogenetically active testes, with spermatocytes already present in the seminiferous lobules and showing full spermatogenesis at 15 months of age. This can be considered a late gonadal development when compared with other species where the testes are fully differentiated and spermatogenetically active long before.

The entire process of gonadogenesis in the Mexican snook resembles to that of the percomorph *Amatitlania nigrofasciata*, where the efferent duct system and seminiferous lobules develop independently and come together at the end of testicular morphogenesis, a process that is thought to be conserved among fishes with lobular unrestricted testicular type (Mazzoni et al. 2014). Fish with other testicular arrangements such as those presenting lobular restricted type or anastomosing tubular unrestricted type possess different mechanisms of gonadal development, as revealed by Mazzoni et al. (2014) in the guppy (*Aterinomorpha*) and the common carp (*Otophysi*), respectively.

The application of hormonal treatments has been widely used in aquaculture to produce monosexual stocks of commercially valuable fish (Schreck 1974). However, in order to be effective, hormonal treatments requires of a full characterization of gonadal morphogenesis, to determine the most sensitive period for hormone application (Nakamura 2013). In this sense, the histological description of early gonadal morphogenesis in the Mexican snook will

be valuable for the implementation of sexual reversion techniques for farming this species in southern Mexico, aiming to reduce the overfishing pressures at which the species has been submitted during the last years (Chávez-Caballero et al. 2014). Besides the external factors described above, internal factors such as the growth rate can also influence the velocity at what gonadal differentiation occurs (Bruslé and Bruslé 1978; Strüssmann and Nakamura 2002). In some teleost species, specimens with larger growth rates differentiate their gonads before than specimens showing lower growth rates (Colombo et al. 1984; Colombo and Grandi 1995). For instance, Grandi and Colombo (1997) reported that the velocity of gonadal differentiation in the European eel (*Anguilla anguilla*) was more related to body size than to age. As a result, a single batch of fish can contain organisms showing variable degrees of gonadal development, even though they are cultured under the same environmental conditions. In the Mexican snook, a similar asynchronous gonadal development occurred from 171 dph forward, which might be due to the differences in sizes rather than the differences in age, as documented in other teleosts.

In conclusion, the gonadal morphogenesis of the Mexican snook produced and maintained in captivity is clearly defined by a period of gonadal undifferentiation that may last until the fish are 6 months old, followed by a prolonged testicular development lasting approximately six months (180 days). The histological analysis of gonadogenesis showed that this species is a protandric hermaphrodite that starts their lifecycle as male. The morphological events documented during the sexual differentiation of the Mexican snook were similar to those described in other teleost species, indicating that the process of gonadal morphogenesis is highly conserved among fishes, regardless of the reproductive strategy or the taxonomic group. The information generated by this research will be useful for future experiments for the sex manipulation of this species for aquaculture purposes.

## Disclosure statement

The authors declare do not to have conflict of interest.

## Funding

This work was partly supported by the US Agency for International Development (USAID) through the AquaFish Collaborative Research Support Program (CRSP) under Grant CA/LWA No. EPP-A-00-06-0012-00; the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. During this study the senior author, Juan Manuel Vidal-López, was supported by a PhD scholarship sponsored by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## References

- Aguilar M, Coutiño BB, Salinas RP. 1996. Manual general de técnicas histológicas e histoquímicas [Handbook of histological and histochemical techniques]. Distrito Federal (Mexico): Las Prensas de Ciencias. Spanish.
- Álvarez-Lajonchère L, Tsuzuki MY. 2008. A review of methods for *Centropomus spp.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research* 39(7), 684-700.
- Avisé C, Mank JE. 2008. Evolutionary perspectives on hermaphroditism in fishes. *Sex Dev.* 3:152–163.
- Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*. 197:283-301.
- Blaber SJM. 1997. Fish and fisheries of tropical estuaries. London (UK): Chapman and Hall. (Fish and fisheries series; vol. 22).
- Braat AK, Speksnijder JE, Zivkovic D. 1999. Germ line development in fishes. *Int J Dev Biol.* 43:745-760.

- Bruslé S, Bruslé J. 1978. An ultrastructural study of early germ cells in *Mugil auratus* Risso, 1810 (Teleostei: Mugilidae). *Ann Biol Anim Bioch Biophys*. 18:1141–1153.
- Colombo G, Grandi G, Rossi R. 1984. Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. *J Fish Biol*. 24:215-228.
- Colombo G, Grandi G. 1995. Sex differentiation in the European eel: histological analysis of the effects of sex steroids on the gonad. *J Fish Biol*. 47:394-413.
- Contreras-García MJ, Contreras-Sánchez WM, Macdonal-Vera A, Hernández-Vidal U. 2017. Masculinization of the native bay snook, *Petenia splendida*, using oral administration of the synthetic steroid 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *J World Aquacult Soc*. <https://doi.org/10.1111/jwas.12449>.
- Chávez HR. 1961. Estudio de una nueva especie de robalo del Golfo de México y redescrición de *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Ciencia* 21(2), 75-83.
- Chávez, HR. 1963. Contribución al conocimiento de la Biología de los robalos, Chucumite y Constantino (*Centropomus undecimalis*) del Estado de Veracruz, México. *Ciencia* 22 (5), 141-161.
- Chávez-Caballero V, Lorán-Nuñez RM, Gómez-Ortiz MG, Garduño-Dionate M, Martínez-Isunza FR, Wakida-Kusunoki AT. 2014. Robalo del Golfo de Mexico: *Centropomus undecimalis* y *Centropomus poeyi* [Snooks from the Gulf of Mexico: *Centropomus undecimalis* y *Centropomus poeyi*] In: Beléndez-Moreno LFJ, Espino-Barr E, Galindo-Cortes G, Gaspar-Dillanes T, Huidobro-Campos L, Morales-Bojórquez E, editors. *Sustentabilidad y pesca responsable en México. Evaluación y manejo [Sustainability and responsible Fishery in Mexico. Diagnostic and Management]*. Distrito Federal (Mexico): Instituto Nacional de Pesca; p. 213-241.

- Cho HC, Hwang IJ, Baek HJ. 2014. Histological analysis of early gonadal development and sex differentiation in chameleon goby, *Tridentiger trigonocephalus*. Dev Reprod. 18(1):51-56.
- Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture. 208:191-364.
- Dildine GC. 1936. Studies in teleost reproduction. I. Embryonic hermaphroditism in *Lebistes reticulatus*. J Morphol. 60:261-277.
- Foyle TP. 1993. A histological description of gonadal development and sex differentiation in the Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and estradiol immersed fry. J Fish Biol. 42:699-712.
- Fuentes D. 1973. Contribución al conocimiento de la biología del robalo prieto (Pisces, *Centropomus poeyi* Chávez) en el área de Alvarado, Veracruz, México. Rev Soc Mex Hist Nat. 34:369-422.
- Gamo H. 1961. On the origin of germ cell and formation of gonad primordia in the medaka, *Oryzias latipes*. Jap J Zool. 13:101-115.
- Grandi G, Colombo G. 1997. Development and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla anguilla*, L. Anguilliformes, Teleostei): A cytological and ultrastructural study. J Morphol. 231:195-216.
- Grier HJ, Taylor RG. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. J. Fish Biol. 53:521-542.
- Grier HJ, Uribe MC. 2009. Chapter 4. Male reproductive system: testis, spermatogenesis and testicular cycles. In: Jamieson B (Ed). Reproductive biology and phylogeny of fish

- (Agnatha and Bony Fishes). Science Publishers, Inc Enfield. NH, USA; Plymouth, UK pp:119-142. ISBN: 978-157808-580-4.
- Guerrero-Estévez S, Moreno-Mendoza N. 2010. Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Rev Fish Biol Fisher.* 20:101-121.
- Guerrero-Estévez S, Moreno-Mendoza N. 2012. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in the viviparous fish *Chapalichthys encaustus* (Teleostei, Cyprinodontiformes, Goodeidae). *J Fish Biol.* 80:572-594.
- Higashino T, Miura T, Miura C, Yamauchi K. 2002. Histological studies on early oogenesis in barfin flounder (*Verasper moseri*). *Zool Sci.* 19:557-563.
- Hliwa P, Demska-Zakes K, Martyniak A, Krol J. 2003. Gonadal differentiation in *Vimba vimba* (L. 1758). *Czech J Anim. Sci.* 48(11):441-448.
- Hoar WS, Randall DJ. 1969. Fish physiology: volume III: Reproduction and growth, bioluminescence, pigments, and poissons. Academic Press.
- Kobayashi K, Suzuki K. 1990. Gonadogenesis and sex succession in the protogynous Wrasse, *Cirrhilabrus temmincki*, in Suruga Bay, Central Japan. *Jpn J Ichthyol.* 37(3):256-264.
- Kobayashi Y, Nagahama Y, Nakamura M. 2013. Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sex Dev.* 7:115–125.
- Koya Y, Fujita A, Niki F, Ishihara E, Miyama H. 2003. Sex differentiation and pubertal development of gonads in the viviparous mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zool Sci.* 20:1231-1242.
- Kubicek KM, Álvarez-González CA, Martínez-García R, Contreras-Sánchez WM, Pohlenz C, Conway KW. 2018. Larval development of the Mexican snook, *Centropomus poeyi* (Teleostei: Centropomidae). *Neotrop Ichthyol.* 16(1):1-8.

- Kuwamura T, Nakashima Y. 1998. New aspects of sex change among reef fishes: recent studies in Japan. *Environ Biol Fishes*. 52:125-135.
- Lombardi J. 1998. Comparative vertebrate reproduction. Massachusetts (USA): Kluwer Academic Publishers.
- Lorán-Nuñez RM, Martínez-Isunza FR, Valdez-Guzmán AJ, Garduño-Dionate M, Martínez-Lorán ER. 2012. Reproducción y madurez sexual de robalo prieto (*Centropomus poeyi*) y robalo blanco (*C. undecimalis*) en el Sistema Lagunar de Alvarado, Veracruz (2005-2007). *Cienc Pesque*. 20(1):49-64.
- Maack G, Segner H. 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. *J Fish Biol*. 62:895-906.
- Maldonado-García M, Gracia-López V, Carrillo M, Hernández-Herrera A, Rodríguez-Jaramillo C. 2005. Stages of gonad development during the reproductive cycle of the black fin snook, *Centropomus medius* Günther. *Aquacult Res*. 36:554-563.
- Mazzoni TS, Grier HJ, Quagio-Grassiotto I. 2014. Male gonadal differentiation and the paedomorphic evolution of the testis in Teleostei. *Anat Rec*. 297:1137-1162.
- Meijide FJ, Lo Nostro FL, Guerrero GA. 2005. Gonadal development and sex differentiation in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light- and Electron-Microscopic Study. *J Morphol*. 264:191-210.
- Miura S, Nakamura S, Kobayashi Y, Piferrer F, Nakamura M. 2008. Differentiation of ambisexual gonads and immunohistochemical localization of P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme during gonadal sex differentiation in the protandrous anemonefish, *Amphiprion clarkii*. *Com Biochem Physiol*. 149:29-37.
- Murata R, Karimata H, Alam MA, Nakamura M. 2009. Gonadal sex differentiation in the Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*. 293:286-289.



- Nakamura M. 2013. Morphological and physiological studies on gonadal sex differentiation in teleost fish. *Aqua Biosci Monogr.* 6(1):1-47.
- Nakamura S, Kobayashi D, Aoki Y, Yokoi H, Ebe Y, Wittbrodt, Tanaka M. 2006. Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos. *Dev Biol.* 295:678-688.
- Nakamura M, Kobayashi T, Chang XT, Nagahama Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J Exp Zool.* 281:362-372.
- Nakamura M, Nagahama Y. 1985. Steroid producing cells during ovarian differentiation of the tilapia, *Sarotherodon niloticus*. *Dev Growth Differ.* 27(6):701-708.
- Nakamura M, Nagahama Y. 1989. Differentiation and development of Leydig cells, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem.* 7:211-219.
- Nakamura M, Takahashi H. 1973. Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull Fac Fish, Hokkaido University*, 24(1): 1-13.
- Nakazono A, Kuwamura T. 1987. Sex change in fishes. Tokyo (Japan): Tokai University Press.
- Nishimura T, Tanaka M. 2014. Gonadal development in fish. *Sex Dev.* 8:252-261.
- Pandian TJ. 2012. Sex determination in fish. Boca Raton (FL): Taylor and Francis Group.
- Pan ZJ, Zhu CK, Wang H, Zhou FJ, Qiang XG. 2017. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in cultured Ussuri catfish *Tachysurus ussuriensis*. *J Fish Biol.* 91(3), 866-879.
- Park IS, Kim JH, Cho SH, Kim DS. 2004. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). *Aquaculture.* 232:183-193.

- Parmentier HK, Timmermans LPM. 1985. The differentiation of germ cells and gonads during development of carp *Cyprinus carpio* L. A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. *J Embryol Exp Morphol.* 90:13-22.
- Passini G, Avelar-Carvalho CV, Sterzelecki FB, Ronzani-Cerqueira V. 2014. Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- $\beta$  oestradiol implants. *Aquacult Res.* 47(4): 1-10.
- Patiño R, Takashima F. 1995. Gonads. An atlas of fish histology, normal and pathological features. Kodansha/Gustav Fisher, Tokyo, 128-153.
- Patiño R, Davis KB, Schoore JE, Uguz C, Strüssmann CA, Parker NC, Simco BA, Goudie C. 1996. Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *J Exp Zool.* 276:209-218.
- Rasmussen TH, Jespersen A, Korsgaard B. 2006. Gonadal morphogenesis and sex differentiation of intraovarian embryos of the viviparous fish *Zoarcetes viviparous* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): a histological and ultrastructural study. *J Morphol.* 267:1032-1047.
- Sadovy de Mitcheson Y, Liu M. 2008. Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish Fish.* 9:1-43.
- Sadovy Y, Shapiro D. 1978. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia* 1987(1):136-156.
- Smith C, Wootton RJ. 2015. The remarkable reproductive diversity of teleost fishes. *Fish Fish.* 17(4):1-8.
- Schreck CB. 1974. Hormonal treatment and sex manipulation in fishes. In: Schreck CB, editor. *Control of sex in fishes.* Blacksburg (VA): Virginia Polytechnic Institute and State University; p. 84-106.

- Strüssmann CA, Nakamura M. 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol Biochem.* 26:13-29.
- Strüssmann CA, Takashima F, Toda K. 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture.* 139:31-45.
- Taylor RG, Whittington JA, Grier HJ, Crabtree RE. 2000. Age, growth, maturation and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coast of South Florida. *Fish Bull.* 98:612-624.
- Uribe MC, Grier HJ, Mejía-Roa V. 2015. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. In Gribbins K (Ed). *Spermatogenesis*, Taylor & Francis Group, LLC. 4:3, e983400, DOI: 10.4161/21565562.2014.983400
- Van Eenennaam JP, Doroshov SI. 1998. Effects of age and body size on gonadal development of Atlantic sturgeon. *J Fish Biol*, 53(3):624-637.
- Vizziano-Cantonnet D, Di Landro S, Lasalle A, Martínez A, Mazzoni TS, Quagio-Grassiotto I. 2016. Identification of the molecular sex-differentiation period in the Siberian sturgeon. *Mol Rep and Dev* 83(1):19-36.

## Figure Legends

**Figure 1. Gonadal differentiation in the Mexican snook. A, B.** Gonadal primordium (gp) were oriented cephalocaudally and suspended from the peritoneal wall. **C, D, E.** *Gonadal Primordium and Undifferentiated Gonad Stage (136-171 dph)*. Migrating primordial germ cells (PGC) colonized the gonadal primordium via the gonadal mesentery (gm), signing the onset of this stage. Only scarce PGCs were observed immersed in the connective tissue of the gonad, surrounded by numerous somatic cells. **F.** *Early Testicular Differentiation Stage (178-213 dph)*. Somatic cells started to proliferate, giving rise to stromatic aggregations (sa). Efferent duct anlagen (eda) appeared for the first time, being the clearest sign of the commitment of the gonad to testis. **G, H.** *Intermediate Testicular Differentiation Stage (227-255 dph)*. **G.** The presumptive testis became regionalized into two zones: the germinal (ger) and the hilar (hr) regions. The development of the efferent duct from the efferent duct anlagen occurred in the hilar region. The germinal region was characterized by intensive proliferation of germ cells, which resulted in the formation of germline nests (nst). **H.** Amplification of the dotted area depicted in **G** showing the regionalization of the gonad at this stage. The hilar region (hr) consisted mainly of connective tissue (ct) and dispersed blood vessels. In the germinal region, germinal cells proliferated and gave rise to germ cell nests (nst) at the periphery of the presumptive testis. bv, blood vessel; gm, gonadal mesentery; gc, germ cell. Hematoxylin-eosin.

**Figure 2. Gonadal differentiation in the Mexican snook. A.** *Intermediate Testicular Differentiation Stage (227-255 dph)*. During this stage, the first A-spermatogonia (Asg) started to differentiate from the gonial cells (go) present in the germline nests. The characteristic feature of A-spermatogonia was the presence of indentations in the nuclear

envelope (see dotted inset and its respective amplification). The inset in the image A shows the morphological difference between A-spermatogonia (Asg) and gonial cells (go). **B, C, D, E.** *Late Testicular Differentiation Stage (269-339 dph)*. **B, C.** The efferent duct (ed) was completely differentiated, and the regionalization of the gonad into germinal (ger) and hilar (hr) regions was maintained. Large blood vessels (bv) appeared in the hilar region (hr), near to the efferent duct. **D, E.** During *Late Testicular Differentiation*, the testis was integrated only by A and B-spermatogonia (Asg and Bsg, respectively), which appear wrapped by the surrounding pre-Sertoli cells (pse). Both types of spermatogonia were found forming part of germline nest (nst) located at the periphery of the testis. B-spermatogonia had smaller size and more condensed nucleus than A-spermatogonia. **F, G.** Intensive proliferation of spermatogonia caused the elongation of the germline nest towards the efferent duct, giving rise to seminiferous lobules (lo), which started to extend towards the efferent duct (ed). ct, connective tissue; ed, efferent duct; bv, blood vessel; sc, somatic cell; ep, external epithelium of the gonad; Asg, A-spermatogonia; Bsg, B-spermatogonia; ms, myoid cells. Hematoxylin-eosin.

**Figure 3. Gonadal differentiation in the Mexican snook. A, B.** *Late testicular differentiation.* As testicular differentiation proceeded, seminiferous lobules (lo) continued to extend towards the efferent duct (ed), located in the hilar region. At the same time, connective tissue (red arrows) from the hilar region (hr) gradually infiltrated into the germinal region (gr) of the gonad. Dotted areas in image B shows two fully differentiated seminiferous lobules (lo) that have already connected with the lumen of the efferent duct (op), while black arrows in the inset point out a panoramic view of connective tissue infiltration across the gonad. **C.** *Full Testicular Differentiation Stage (355-367 dph).*

Testes were fully developed and showed active spermatogenesis in the seminiferous lobules, evidenced by the presence of spermatogenic cells, mainly primary spermatocytes (sc1). An spermatocyst containing primary spermatocytes is encircled with a dotted line. Note the nucleus of a Sertoli cell (se) forming the wall of the spermatocyst. **D, E, F.** *Testicular maturation in the Mexican snook.* **D.** Transversal section of a fully spermatogenetically active testis in “developing phase”. **E.** Amplification of the dotted area depicted in D. The testicular parenchyma (tp) is comprised by numerous seminiferous lobules. Note that spermatozoa are present all across the testis, in both seminiferous lobules and the efferent duct (ed). **F.** Micrograph of the periphery of a spermatogenetically active testis showing almost all the stages of the spermatogenesis: A-spermatogonia (Asg), B-spermatogonia (Bsg), secondary spermatocytes (sc2), spermatids (sd) and spermatozoa (sz). The dotted area shows a seminiferous lobule (lo) extending from the periphery of the testis to the efferent duct. Mature spermatozoa (sz) are observed in the lumen (lu) of seminiferous lobules. ct, connective tissue; ed, efferent duct; bv, blood vessel; Asg, A-spermatogonia; Bsg, B-spermatogonia; ta, tunica albuginea. Hematoxylin-eosin.

Figure 1

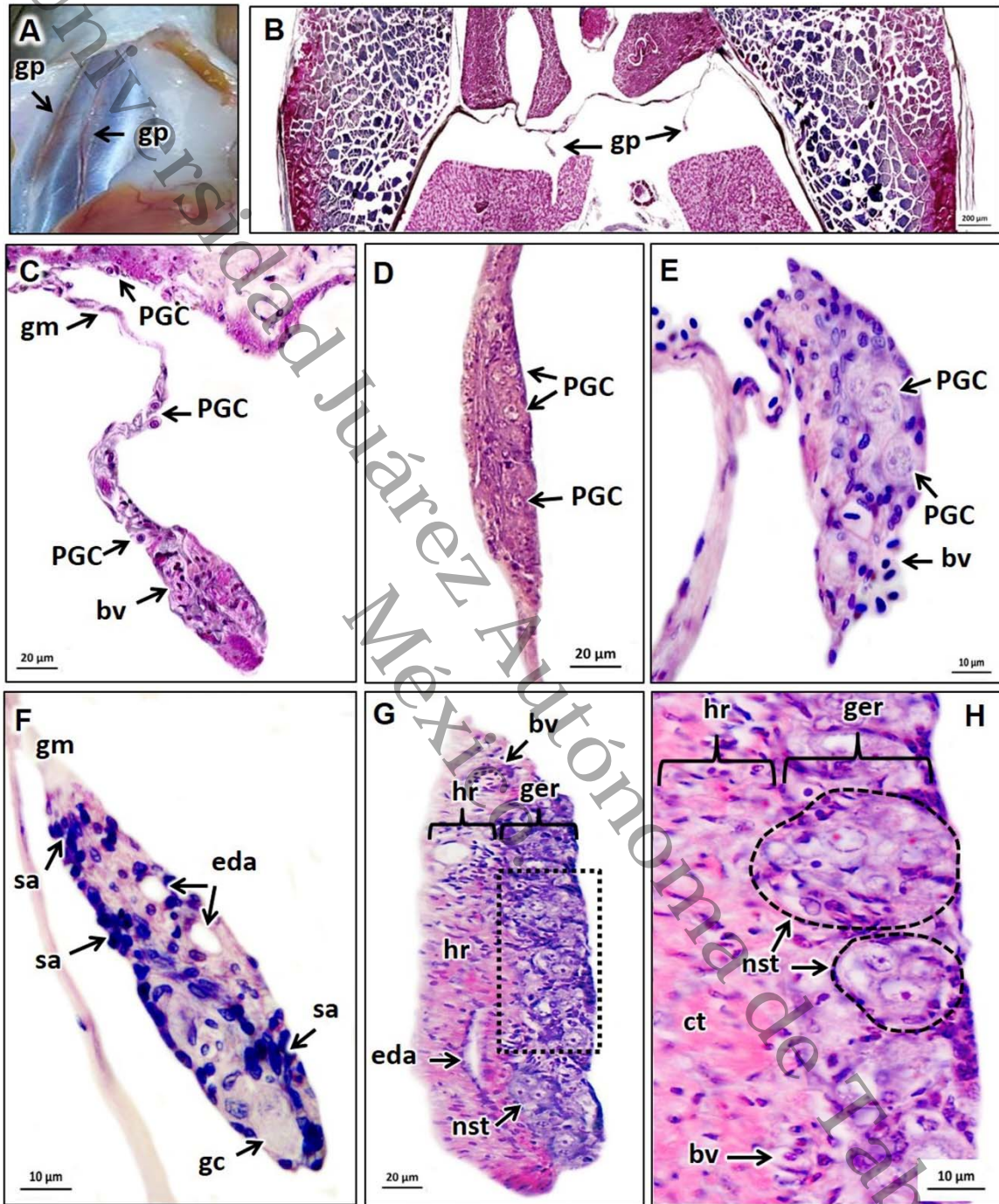


Figure 2

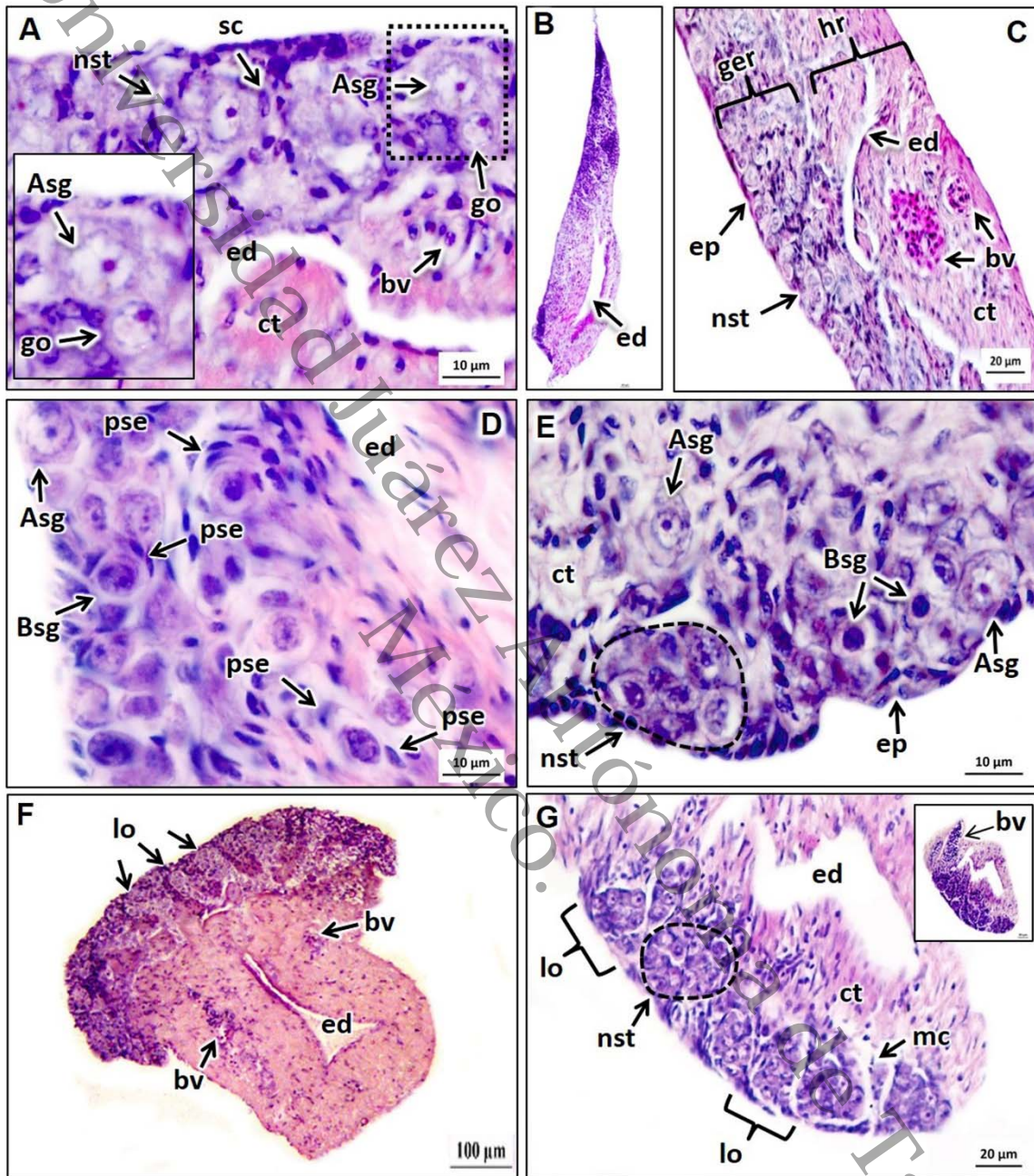
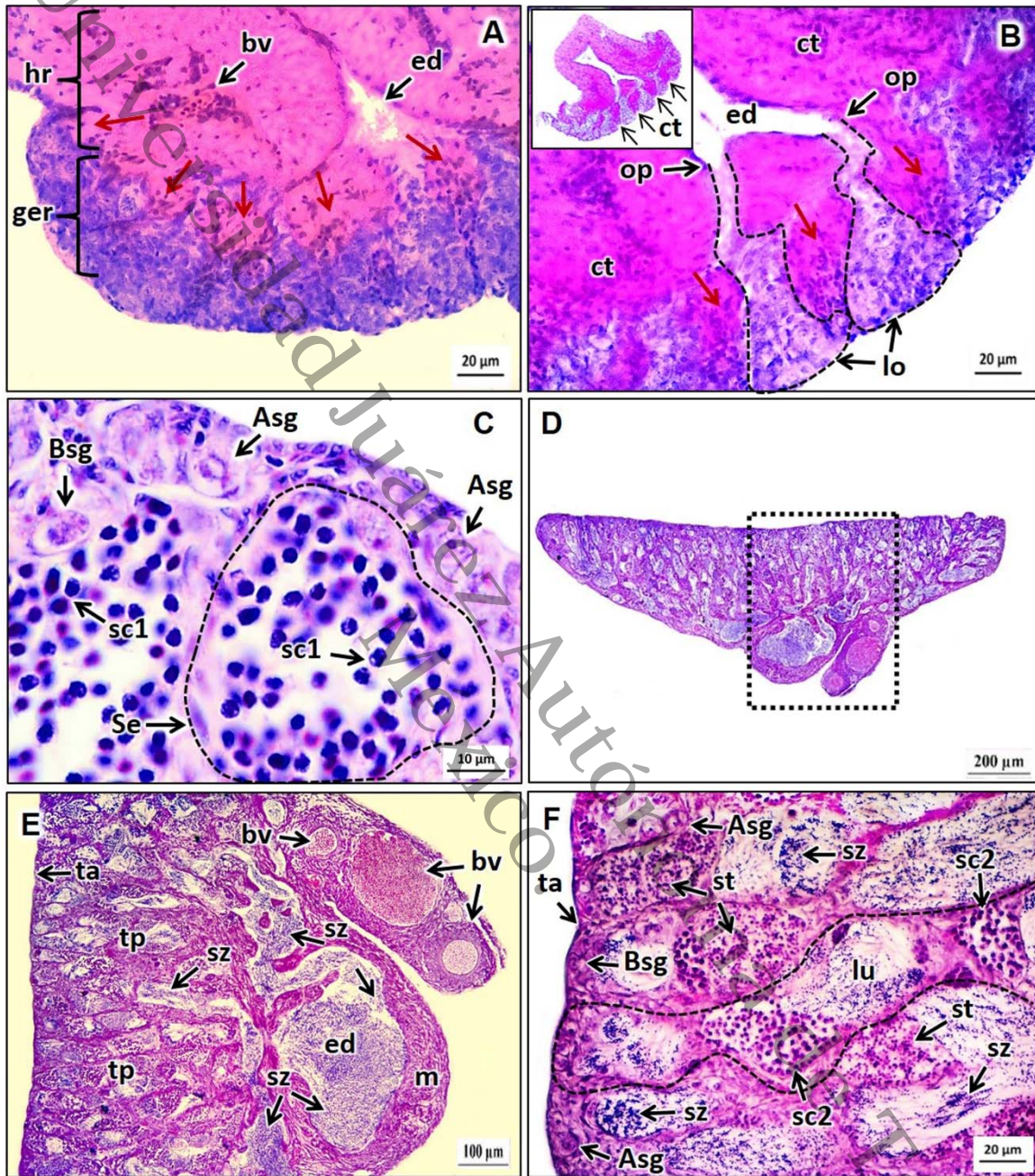




Figure 2



## Guía para autores

### Marine and Freshwater Behaviour and Physiology Journal

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements.

#### ScholarOne Manuscripts

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

This title utilises format-free submission. Authors may submit their paper in any scholarly format or layout. References can be in any style or format, so long as a consistent scholarly citation format is applied. For more detail see [the format-free submission section below](#).

#### Contents

- [About the Journal](#)
  - [Peer Review and Ethics](#)
  - [Preparing Your Paper](#)
  - [Structure](#)
  - [Word Limits](#)
  - [Format-Free Submissions](#)
  - [Editing Services](#)
  - [Checklist](#)
  - [Using Third-Party Material](#)
  - [Submitting Your Paper](#)
  - [Data Sharing Policy](#)
  - [Publication Charges](#)
  - [Copyright Options](#)
  - [Complying with Funding Agencies](#)
  - [Open Access](#)
  - [My Authored Works](#)
  - [Reprints](#)

## About the Journal

*Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

The journal aims to promote the work of early career researchers. When the first-author is a graduate student or post-doctoral researcher, this should be indicated in the ScholarOne system at submission. Accepted papers from such authors will be given prominence in their publication issue.

Authors of accepted papers are requested to submit a photograph (non-copyright and preferably taken by them) of their study species suitable for publication on the front cover of the journal. One photograph will be chosen by the Editorial Board for each issue.

## Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be double blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

## Preparing Your Paper

### Structure

*Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* accepts the following types of article: Research Article, Review Article, Rapid Communication, Technical Note. For Research and Review Articles, the format follows the standard sections of Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and References (see the style guidelines below for further details). Rapid Communications and Technical Notes do not have an abstract and are written as a narrative without sub-headings.

At first mention of species within the main body of the text, they should be presented by their common name with the Latin name in brackets e.g. yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), and thereafter referred to by their common name throughout. Within the title, abstract, figure and table captions, species names should be presented as common name (Latin name).

## Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

## Format-Free Submission

Authors may submit their paper in any scholarly format or layout. Manuscripts may be supplied as single or multiple files. These can be Word, rich text format (rtf), open document format (odt), or PDF files. Figures and tables can be placed within the text or submitted as separate documents. Figures should be of sufficient resolution to enable refereeing.

- There are no strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the essential elements needed to evaluate a manuscript: abstract, author affiliation, figures, tables, funder information, and references. Further details may be requested upon acceptance.
- References can be in any style or format, so long as a consistent scholarly citation format is applied. Author name(s), journal or book title, article or chapter title, year of publication, volume and issue (where appropriate) and page numbers are essential. All bibliographic entries must contain a corresponding in-text citation. The addition of DOI (Digital Object Identifier) numbers is recommended but not essential.
- The journal reference style will be applied to the paper post-acceptance by Taylor & Francis.
- Spelling can be US or UK English so long as usage is consistent.

Note that, regardless of the file format of the original submission, an editable version of the article must be supplied at the revision stage.

## Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

## Checklist: What to Include

1. **Author details.** All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new

affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship.](#)

2. Should contain an unstructured abstract of 300 words.
3. **Graphical abstract** (optional). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .tiff. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.
4. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.](#)
5. Between 3 and 6 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
6. **Funding details**. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:

*For single agency grants*

This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].

*For multiple agency grants*

This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].

7. **Disclosure statement**. This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.](#)
8. **Data availability statement**. If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
9. **Data deposition**. If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
10. **Geolocation information**. Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others. [More information.](#)
11. **Supplemental online material**. Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article.](#)
12. **Figures**. Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files

are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.

13. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
14. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
15. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

### Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

### Submitting Your Paper

Please note that *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

### Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

### **Publication Charges**

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

### **Copyright Options**

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements.](#)

### **Complying with Funding Agencies**

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

### **Open Access**

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact [openaccess@tandf.co.uk](mailto:openaccess@tandf.co.uk) if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

### **My Authored Works**

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

### **Article Reprints**

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at [reprints@tandf.co.uk](mailto:reprints@tandf.co.uk). You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).

### **Queries**

Should you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us [here](#).

### **Browse journals by subject**

- [Area Studies](#)
- [Arts](#)
- [Behavioral Sciences](#)
- [Bioscience](#)
- [Built Environment](#)
- [Communication Studies](#)
- [Computer Science](#)
- [Development Studies](#)
- [Earth Sciences](#)
- [Economics, Finance, Business & Industry](#)
- [Education](#)



- [Engineering & Technology](#)
- [Environment & Agriculture](#)
- [Environment and Sustainability](#)
- [Food Science & Technology](#)
- [Geography](#)
- [Health and Social Care](#)
- [Humanities](#)
- [Information Science](#)
- [Language & Literature](#)
- [Law](#)
- [Mathematics & Statistics](#)
- [Medicine, Dentistry, Nursing & Allied Health](#)
- [Museum and Heritage Studies](#)
- [Physical Sciences](#)
- [Politics & International Relations](#)
- [Social Sciences](#)
- [Sports and Leisure](#)
- [Tourism, Hospitality and Events](#)
- [Urban Studies](#)

#### **Information for**

- [Authors](#)
- [Editors](#)
- [Librarians](#)
- [Societies](#)

#### **Open access**

- [Overview](#)
- [Open journals](#)
- [Open Select](#)
- [Cogent OA](#)

#### **Help and info**

- [Help & contact](#)
- [Newsroom](#)
- [Commercial services](#)
- [All journals](#)

#### **Keep up to date**

Register to receive personalized research and resources by email

[Sign me up](#)

[Taylor and Francis Group Facebook page](#)

[Taylor and Francis Group Twitter page](#)

[Taylor and Francis Group LinkedIn page](#)

[Taylor and Francis Group Youtube page](#)

[Taylor and Francis Group Weibo page](#)

**Copyright © 2019 Informa UK Limited** [Privacy policy & cookies](#) [Terms & conditions](#) [Accessibility](#)

Registered in England & Wales No. 3099067

5 Howick Place | London | SW1P 1WG

México. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

# CAPITULO 3

Functional feminization of the Mexican snook (*Centropomus poeyi*), using  $17\beta$ -estradiol in the diet

Publicado en:

Latin American Journal of Aquatic Research

Vidal-López, J. M., Contreras-Sánchez, W. M., Hernández-Franyutti, A., Contreras-García, M. D. J., & Uribe-Aranzábal, M. D. C. (2019). Functional feminization of the Mexican snook (*Centropomus poeyi*) using  $17\beta$ -estradiol in the diet. *Latin american journal of aquatic research*, 47(2), 240-250.

1 Functional feminization of the Mexican snook (*Centropomus poeyi*), using 17 $\beta$ -estradiol in the  
2 diet

3  
4 Feminización funcional del robalo Mexicano (*Centropomus poeyi*), empleando 17 $\beta$ -estradiol en  
5 la dieta

6  
7 Functional feminization of the Mexican snook

8  
9  
10 Juan Manuel Vidal-López<sup>1</sup>, Wilfrido M. Contreras-Sánchez<sup>1\*</sup>, Arlette Hernández-Franyutti<sup>1</sup>,  
11 María de Jesús Contreras-García<sup>1</sup> and María del Carmen Uribe-Aranzábal<sup>2</sup>

12  
13  
14 <sup>1</sup>Tropical Aquaculture Laboratory, Biological Sciences Division, Juarez Autonomous University  
15 of Tabasco, Km 0.5 Carretera Villahermosa, Tabasco, C. P. 86040

16 <sup>2</sup>Animal Reproduction Biology Laboratory. Comparative Biology Department, Faculty of  
17 Sciences, National Autonomous University of Mexico

18  
19  
20  
21  
22  
23 \*Corresponding author: Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias  
24 Biológicas. Km 0.5, Carretera Villahermosa-Cardenas, Entronque a Bosques de Saloya.  
25 Villahermosa, Centro, Tabasco. CP 86039. Tel. (993) 358 1500 ext. 6425. Email address:  
26 [contrerw@hotmail.com](mailto:contrerw@hotmail.com)

27

## Abstract

The Mexican snook, *Centropomus poeyi*, supports an important fishery in southeastern Mexico. Due to its protandrous hermaphroditism, females may be especially sensitive to overfishing because they tend to be larger and selective removal has the potential to negatively affect natural populations, thus making urgent the need to contribute on management strategies for the species. The objective of this study was to produce batches of reproductive females at an early age and a small size by using 17 $\beta$ -estradiol (E2) in the diet. In two separate experiments, we fed fish 0, 10, 20, 30, 40, 50, or 60 mg of 17 $\beta$ -estradiol per kg of food for 60 days during gonadal differentiation. Fish fed with 50 and 60 mg of E2 per kg of food resulted in 100% feminization, while the control group (0 mg of E2) was 100% male. Three years after feminization, sex-reversed fish remained female, producing oocytes and were capable of spawning, while fish in the control group were ripe males with running milt. E2-treated groups were significantly larger (weight and length) than the control groups for up to six months after treatment, but the difference was undetectable at 300 days post-treatment. Survival was high in all treatments (100%). We obtained high percentages of functional females using dosages of 50 and 60 mg kg<sup>-1</sup> of E2 for 60 days, with 80% of the induced fish spawning and producing fertilized eggs and larvae. The results obtained in this study provide opportunities for broodstock management and sex manipulation.

*Key words:* sex-inversion, functional females, snook culture.

**Resumen.** El robalo Mexicano, *Centropomus poeyi*, soporta una pesquería importante en el sureste Mexicano. Debido a su hermafroditismo protándrico, las hembras son especialmente susceptibles a la sobrepesca debido a que tienden a ser más grandes y su remoción selectiva tiene el potencial de impactar negativamente las poblaciones naturales, haciendo más urgente la necesidad de contribuir con estrategias de manejo para la especie. El objetivo de este estudio consistió en producir lotes de hembras reproductivas a una edad temprana y de pequeño tamaño mediante el empleo de 17 $\beta$ -estradiol (E2) en la dieta. En dos experimentos separados, alimentamos los peces con 0, 10, 20, 30, 40, 50, o 60 mg of 17 $\beta$ -estradiol por kg de alimento, por 60 días, durante diferenciación gonadal. Los peces alimentados con 50 y 60 mg de E2 por kg de alimento resultaron en un 100% de feminización, mientras que el grupo control (0 mg de E2) estuvo compuesto por 100% machos. Tres años después de la feminización, los peces revertidos

59 se mantuvieron como hembras, producían ovocitos y fueron capaces de desovar. Mientras que los  
60 peces del grupo control fueron machos maduros con esperma fluido. Los grupos tratados con E2  
61 fueron significativamente más grandes (peso y longitud) que el grupo control por hasta seis  
62 meses después del tratamiento, pero estas diferencias no fueron detectables a los 300 días post-  
63 tratamiento. La supervivencia fue alta en todos los tratamientos (100%). Obtuvimos altos  
64 porcentajes de hembras funcionales empleando las dosis de 50 y 60 mg kg<sup>-1</sup> de E2 por 60 días,  
65 con un 80% de los peces inducidos desovando y produciendo huevos fertilizados y larvas. Los  
66 resultados obtenidos en este estudio proveen oportunidades para el manejo de reproductores y la  
67 manipulación sexual.

68 *Palabras clave:* inversión sexual, hembras funcionales, cultivo de robalo.

69

## 70 **Introduction**

71 Several centropomid species support important recreational and commercial fisheries in the  
72 Gulf of Mexico (Tucker, 2003; Alvarez-Lajonchère and Tsuzuki 2008). Recent harvest rates in  
73 this region are lower than in the previous decade (UN-FAO, 2011; Chávez-Caballero, *et al.*,  
74 2014). In Mexico, snooks command high prices. In 2013, the reported landing of snooks in  
75 Mexico was 8,085 t, with 75% of the total catch from the Gulf of Mexico (SAGARPA, 2017).  
76 Unfortunately, all snook species captured are reported under the generic category of “snooks”  
77 (UN-FAO, 2011). This broad labelling of landed species impedes the assessment of fisheries at  
78 the species level.

79 *Centropomus poeyi* is an endemic species that occurs only in watersheds located between the  
80 Mexican states of Tamaulipas and Campeche that discharge into the Gulf of Mexico (Chávez,  
81 1961 and 1963). Contrary to *C. parallelus* and *C. undecimalis*, the Mexican snook spends most of  
82 its life cycle in rivers and lagoons, migrating to the ocean only to spawn (Chávez, 1981). The  
83 Mexican snook is a piscivorous species, reaching a total length of up to 110 cm and a weight of  
84 14 kg, with females been significantly larger than males (Loran-Núñez *et al.*, 2012; Chávez-  
85 Caballero, 2014). Very little is known about the biology, ecology, or population status of the  
86 Mexican snook. While all snooks are considered protandric hermaphrodites (Alvarez-Lajonchère  
87 and Tsuzuki, 2008), only *C. undecimalis* is documented as such (Taylor *et al.*, 2000).

88 The potential for snook aquaculture has been highlighted and specific studies have developed  
89 methods for culturing *C. undecimalis* and *C. parallelus* (Zarza *et al.*, 2006; Lajonchère and

90 Tsuzuki, 2008; Yanes-Roca, *et al.*, 2009; Cerqueira and Tsuzuki, 2009; Ibarra-Castro *et al.*, 2011;  
91 Contreras-García, 2015). However, there are no experimental studies on the culture of *C. poeyi* in  
92 captivity. In our facilities, we have observed that *C. poeyi* has advantages over other  
93 centropomids (i.e. large size, high tolerance to handling, grow-out in a wide range of salinities,  
94 and fast growth). Broodstock management for *C. poeyi* is complicated because females range  
95 from five to ten kg. This makes operations expensive, not to mention the risks associated to  
96 maintaining large fish captive. Therefore, the aim of this study was to produce batches of  
97 reproductive females at an early age and a small size through induced sex inversion using 17 $\beta$ -  
98 estradiol in this hermaphroditic species. This natural oestrogen has been frequently used in  
99 gonochoristic species; however, there are few studies on induced feminization in hermaphroditic  
100 fishes. In this study, we investigated the effect of different dosages of the steroid 17- $\beta$ -estradiol  
101 on the sex ratios, growth, reproductive viability, and survival of *C. poeyi*.

## 102 **Materials and methods**

103 *Broodstock and larvae production.* Wild-caught broodstock were maintained in 63 m<sup>3</sup> circular  
104 plastic tanks (9 m diameter) with a daily 10% water exchange and natural photoperiod at the  
105 Marine Aquaculture Station, Biological Sciences Division, Juárez Autonomous University of  
106 Tabasco located in Jalapita, Centla, Tabasco (MAS-UJAT). In two separate spawning events, one  
107 mature female and two males (average weight 5,550  $\pm$  223 g and 3,000  $\pm$  68 g, respectively) were  
108 induced using handmade cholesterol implants with 200  $\mu$ g per fish of LHRHa (Syndel, Western  
109 Chemical, Fendale, WA, USA) and placed in a fiberglass spawning tank (4 m diameter, 1 m  
110 depth). Spawning began after 27 h; fertilized eggs were collected using a 400- $\mu$ m soft-mesh net.  
111 Embryos were placed in 500 L fiberglass tanks, and hatching started 44 h later. The yolk-sac  
112 larvae were maintained in these tanks with a daily 80% water exchange and continuous aeration.  
113 Salinity (28.6  $\pm$  1.9 ppt), dissolved oxygen (6.6  $\pm$  1.1 mg L<sup>-1</sup>), and temperature (27.1  $\pm$  2.5°C)  
114 were monitored daily. At 15 days post-hatching (dph), salinity was gradually lowered (5 ppt per  
115 day) until the fish were in fresh water. Tanks were filled with salt water and stocked with a mix  
116 of the green microalgae *Tetraselmis chuii*, *T. suecica*, and *Nannochloropsis oculata* (2-4  $\times$  10<sup>5</sup>  
117 cells mL<sup>-1</sup>). Rotifer supplementation was initiated with *Brachionus rotundiformis* at 20  
118 rotifers/mL; at 11 dph, the density was decreased to 15 rotifers/mL and *B. plicatilis* was added at  
119 a density of 15 rotifers /mL, making a total of 30 rotifers/mL until 22 dph. At 13 dph, *Artemia*  
120 nauplii were added to the mix at a rate of 30 org/mL, until 22 dph. Larvae were weaned onto

121 commercial food (Gemma Wean™, Skretting; proximate composition: 62% protein, 14% lipid,  
122 8% ash, 0.2% fiber) beginning at 20 dph and continued for six months. After six months, fish  
123 were fed Europa™, (Skretting; proximate composition: 55% protein, 15% lipid, 12% ash, 1.0%  
124 fiber and 8.5% moisture).

125 *Specimen procurement.* Two experiments were carried out at the Tropical Aquaculture  
126 Laboratory, Biological Sciences Academic Division, Juárez Autonomous University of Tabasco.  
127 Juveniles were obtained from induced spawnings in October 2013 and October 2014.

128 Experimental juvenile fish (120 and 240) were randomly selected for experimental groups I and  
129 II, respectively. Juveniles were 340 dph in experiment I and 227 dph in experiment II. Pre-  
130 treatment gonadal condition was determined with conventional hematoxylin–eosin staining.

131 *Experimental design.* To evaluate the feminizing effects of E2 in food, separate experiments were  
132 carried out using a completely randomized design with one factor (E2 dose). Each experiment  
133 consisted of four treatments that were run in triplicate. In the first experiment, we evaluated 40,  
134 50, and 60 mg E2 kg<sup>-1</sup> of food. In the second experiment, we assessed the effects of 10, 20, and  
135 30 mg E2 kg<sup>-1</sup> of food. In both experiments, a control group (0 mg E2 kg<sup>-1</sup> of food) was included.  
136 Ten juveniles were randomly placed in each experimental unit for the first experiment, with an  
137 initial average total length of 150.2 ± 1.6 mm, and weight of 30.1 ± 9.8 g. For the second  
138 experiment, we used 20 juveniles per replicate, with an initial average total length of 73.7 ± 4.5  
139 mm, and weight of 2.8 ± 0.4 g. Both experiments were carried out in a closed recirculating  
140 system, consisting of twelve 2,000 L capacity circular tanks. All tanks were filled with non-  
141 chlorinated freshwater and kept under chemical and mechanical filtration during the experiment.  
142 The water was filtered over a homemade filter tank to remove residual E2 and sediments. This  
143 filter was built using a 200 L plastic tank (60 cm diameter, 90 cm height) containing three layers  
144 of filtering materials: a) 5 kg of granular activated charcoal (Silva *et al.*, 2012) contained in a  
145 plastic mosquito mesh bag (1 mm-mesh size); b) 10 kg of crushed oyster shells; and c) 10 kg of  
146 fine gravel. Water passed by gravity to a 5,000 L reservoir tank, and recirculated into the fish  
147 tanks by using a 1.5 horsepower suction pump equipped with a pressured sand filter (Jacuzzi  
148 L190, Little Rock, AR, USA). Waste accumulated in the fish tanks was siphoned daily, and 30%  
149 of the water was replaced once a week. Replicates from the control group were maintained in  
150 similar tanks separated from the recirculating system.



151 *Experimental diets.* In both experiments we fed the fish with commercial marine-fish food  
152 Europa® (55% protein) impregnated with the different dosages of E2. The protocol proposed by  
153 Popma and Green (1990) was used to impregnate the food with 17β-estradiol, varying the  
154 dosages for each treatment. Briefly, the desired dose of E2 (Sigma-Aldrich Co., St Louis,  
155 Missouri, USA) was dissolved in 100 ml 96% ethanol and sprayed onto 1 kg of the powdered  
156 food. Ethanol was left to evaporate at ambient temperature in a dark room, and afterwards the  
157 food was stored refrigerated at 4 °C. Food for the control groups was impregnated with 96%  
158 ethyl alcohol only. Fish were fed until apparent satiation at 8:00, 11:00, 14:00, and 17:00 h,  
159 during a 60-day period for both experiments.

160 *Water quality.* Dissolved oxygen, temperature, and pH were measured in both experiments.  
161 Dissolved oxygen ( $6.02 \pm 0.02$  and  $6.4 \pm 0.03$  mg L<sup>-1</sup>) was measured with a YSI Model 55  
162 oxygen meter (Yellow Springs, OH, USA), and temperature ( $30.2 \pm 0.14$ °C and  $29.5 \pm 0.16$ °C)  
163 with a digital thermometer (YSI 55, Yellow Springs OH, USA). The pH ( $6.5 \pm 0.07$  and  $7.1 \pm$   
164  $0.09$ ) was measured using a pH meter (Denver Instrument UB-10, Denver, CO, USA). We  
165 measured ammonia ( $0.1 \pm 0.01$  and  $0.14 \pm 0.011$  mg L<sup>-1</sup>), nitrite ( $0.01 \pm 0.01$  and  $0.012 \pm 0.013$   
166 mg L<sup>-1</sup>), and nitrate ( $0.5 \pm 0.03$  and  $0.7 \pm 0.04$  mg L<sup>-1</sup>) concentrations with a multiparameter  
167 meter (Hanna Instruments, HI 98311, Woonsocket, RI, USA) every week.

168 *Growth and survival assessment and histological analysis.* Once the E2 exposure period  
169 concluded, we carried out three samplings (30, 180, and 300 days post treatment) using a similar  
170 procedure in both experiments. At the end of each treatment, and in the subsequent samplings,  
171 weight was determined with an analytical scale (Ohaus®, Pine Brook, New Jersey, USA), with an  
172 accuracy of 0.001 g, and we measured total length with digital vernier calipers (Carbon fiber  
173 Composites Digital® Atlanta, Georgia, USA), with an accuracy of 0.1 mm. Measurements were  
174 made on all specimens in each treatment. Survival was evaluated by counting the fish from each  
175 experimental unit at the end of the experiments. To determine sex ratio, subsamples were  
176 randomly taken from each replicate at each sampling time (n = 3, 2, and 1) totaling 18 per  
177 treatment in experiment I and 27 for experiment II (n = 3, 3, and 3). A total of 12 (experiment I)  
178 and 33 (experiment II) fish per treatment remained after assessment of sex ratios for viability  
179 trials. Sampled fish were sacrificed with an overdose of tricaine methanesulphonate (MS-222; 1g  
180 L<sup>-1</sup>). Afterwards, the fish were dissected, and the gonads were removed, fixed for 24 h in Bouin's  
181 solution, and then maintained in 50% ethyl alcohol. Samples were processed and stained with

182 hematoxylin–eosin (H–E) (Aguilar *et al.*, 1996). Slides were examined with a compound  
183 microscope (Zeiss<sup>®</sup>, Göttingen, Germany) with 10× and 40× objectives. Sex was assigned  
184 histologically using the criteria for *C. undecimalis* adults as reported by Grier and Taylor (1998)  
185 and Grier (2000); for juveniles of the same species as reported by Huber (2014); and as reported  
186 for other teleost fish species by multiple studies (Nakamura *et al.*, 1998; Devlin and Nagahama,  
187 2002; Strüssmann and Nakamura, 2002; Mejjide *et al.*, 2005).

188 *Female maturation and viability.* All remaining fish from treatments with 50 and 60 mg kg<sup>-1</sup> (24)  
189 and the control groups (45) were implanted with a PIT tag (Avid Identification Systems, Inc.;  
190 Norco, California, USA) in the body cavity and moved to the marine station (MAS-UJAT) for  
191 grow-out and spawning trials. At four years of age, during the spawning season (July-  
192 September), the fish kept for reproduction trials were anaesthetized with clove oil (0.015 mL L<sup>-1</sup>)  
193 and checked for maturity. Each remaining female and male were checked for maturity by taking  
194 oocytes or sperm from the genital pore with a polyethylene cannula. The fish were declared as  
195 mature when females presented vitellogenic oocytes and males, if running milt was present.  
196 Oocyte diameter and maturity stage were determined for every fish. Five females (449.46 ±  
197 161.33 g and 37.17 ± 4.47 cm) were selected for viability trials based on having oocytes larger  
198 than 150 µm in diameter. Ten males (317.36 ± 11.36 g and 34.50 ± 3.75 cm) with running milt  
199 were also selected. All selected fish were implanted with LHRH-a (150 µg kg<sup>-1</sup>) handmade  
200 cholesterol-cellulose implants in the body cavity, near the pelvic fin. Fish were then placed in a  
201 12.5 m<sup>3</sup> tank where salinity (30.67 ± 1.67 ppt), temperature (29.96 ± 0.86 °C), dissolved oxygen  
202 (5.98 ± 0.43 mg L<sup>-1</sup>), and pH (8.46 ± 0.22) were monitored three times a day. Five spawning  
203 trials were conducted using one female and two males per trial.

204 *Statistical analysis.* The effects of different E2 treatments on the sex ratio, growth (total length  
205 and weight), and survival rate, were analyzed using one-way ANOVA. Data expressed as  
206 percentages were arcsine-transformed before the ANOVA; however, sex ratios are reported as  
207 percentages. If the ANOVA revealed significant differences, Tukey's post-hoc test was  
208 performed. Normality (Shapiro–Wilk test) and variance homogeneity (Levene's test) were  
209 previously tested in all cases. All statistical analyses were performed using the Statgraphics  
210 Centurion<sup>®</sup> program, v XVI, (level of significance  $\alpha < 0.05$ ).

## 211 **Results**

212 *Feminization.* A significantly higher percentage of females were obtained in the E2 treatments ( $P$   
213  $< 0.001$ ). Induced females exhibited a normal pattern of ovarian development (Figure 1) while  
214 the control groups consisted exclusively of males (Figure 2). The fish fed with 50 and 60 mg of  
215 E2  $\text{kg}^{-1}$  of food consistently produced 100% females, in the three consecutive samplings. Fish fed  
216 with 40 mg of E2  $\text{kg}^{-1}$  of food produced significantly fewer ( $77.8\% \pm 5.6 \text{ SE}$ ) females ( $P < 0.05$ )  
217 compared to fish fed the highest dosages (Fig. 3). In the control group, 100% males were  
218 consistently obtained at all sampling times, with different phases of spermatogenesis (Fig. 4).  
219 In experiment II, a significant proportion of females was obtained in each treatment ( $P < 0.05$ ).  
220 As in experiment I, control group was all males, while fish fed the three E2 diets resulted in 37 to  
221 63% females (Fig. 5). Fish fed 10 mg E2  $\text{kg}^{-1}$  of food resulted in only  $37.0 \pm 6.4\%$  females, a  
222 significantly lower percentage ( $P < 0.05$ ) compared to those fed 20 and 30 mg E2  $\text{kg}^{-1}$  of food  
223 ( $59.7$  and  $63.3\%$  females  $\pm 6.4 \text{ SE}$ ). Histological analysis confirmed that females developed  
224 ovaries with evidence of primary growth oocytes (Fig. 6).

225 *Growth and survival.* In experiment I, the total length and final weight in all three samplings  
226 differed significantly among treatments ( $P < 0.05$ ). At 30 days post treatment, the longest  
227 ( $187.20 \pm 12.0 \text{ mm}$ ) and the heaviest ( $55.46 \pm 3.50 \text{ g}$ ) fish were obtained from the 60 mg E2  $\text{kg}^{-1}$   
228 treatment groups. Fish in the control group had the least growth ( $164.90 \pm 11.7 \text{ mm}$  and  $35.93 \pm$   
229  $2.96 \text{ g}$ ). After 180 days post-treatment, the highest growth rates were found in the 60 mg E2  $\text{kg}^{-1}$   
230 of food treatment, and the lowest growth rates occurred in the control group. At 300 days, post-  
231 treatment, no significant statistical differences ( $P > 0.05$ ) were found in total length and weight  
232 (Table 1). In experiment II, the total length and final weight for all three samplings differed  
233 significantly among the treatments ( $P < 0.05$ ). At 30 days, the fastest growth in total length was  
234 observed in the treatment with 20 mg E2  $\text{kg}^{-1}$  of food ( $187.20 \pm 12.0 \text{ mm}$ ), and the greatest  
235 increase in weight was observed in the 30 mg E2  $\text{kg}^{-1}$  group ( $55.46 \pm 3.50 \text{ g}$ ). The least growth  
236 was observed in the control group. At 180 days, fish treated with 30 mg E2  $\text{kg}^{-1}$  of food had the  
237 highest growth rates ( $215.57 \pm 19.20 \text{ mm}$  of total length and  $58.80 \pm 1.00 \text{ g}$  of weight). As in the  
238 previous experiment, the fish from the control group grew the least. Finally, at 300 days,  
239 significant differences persisted (Table 2). Survival was 100% in all treatments, for both  
240 experiments (Tables 1 and 2).

241 *Sexual maturation and reproductive viability.* All fish treated with 50 and 60  $\mu\text{g}$  E2  $\text{kg}^{-1}$  of food  
242 (experiment I) that were kept for sexual maturity assessments and viability tests were females.

243 producing oocytes (30 to 300  $\mu\text{m}$  in diameter); while fish (45) from the control group were all  
244 males with running milt. Five of the females obtained through sex inversion had oocytes larger  
245 than 150  $\mu\text{m}$  and were selected for induced spawning trials. Four of these females (80%)  
246 spawned, and produced fertilized eggs and larvae. An average of  $386,425 \pm 43,922$  eggs were  
247 produced per female. The fertilization rate averaged  $76.4 \pm 14.71\%$ . The average number of  
248 larvae obtained in each spawning trial was  $243,621 \pm 3,813$ .

## 249 **Discussion**

250 Results indicate that strongly skewed populations with functional females can be obtained  
251 from immature males after feminization using 50 or 60 mg E2  $\text{kg}^{-1}$  of food, for 60 days. Females  
252 obtained through sex inversion are fertile organisms of small size that can be induced to spawn  
253 and produce larvae. Induction of sex change in teleost fish is possible because germ cells are  
254 bipotential and their sensitivity to exogenous hormones allow disruption of the natural  
255 biochemical processes that govern sex differentiation, overriding normal developmental patterns  
256 even after gonadal differentiation has taken place (Devlin and Nagahama, 2002; Strüssmann and  
257 Nakamura, 2002). This plasticity in sexual development is the key to sexual manipulation in fish  
258 and can be effective even in the presence of genetic material for sex determination (Yamamoto,  
259 1969; Goudie *et al.*, 1983; Pandian and Sheela, 1995; Piferrer, 2001; Devlin and Nahagama,  
260 2002). Such manipulation of gonadal development by steroid induction has been used to obtain  
261 single-sex populations (Baroiller *et al.*, 1999; Devlin and Nahagama, 2002; Strüssmann and  
262 Nakamura, 2002; Omoto *et al.*, 2002), aiming to increase productivity by avoiding unwanted  
263 reproduction, favor the sex with fastest growth, and produce groups of females with enhanced  
264 production of eggs (Beardmore *et al.*, 2001; Piferrer, 2001; Devlin and Nahagama, 2002; Frisch,  
265 2004).

266 In an extensive review, Piferrer (2001) cites over 50 species in which feminization has been  
267 carried out, with salmonids and cichlids been the most representative groups. These studies have  
268 examined the use of different steroids and dosages, lengths of steroid treatment and gonad  
269 development. With centropomids, specifically *C. undecimalis* and *C. parallelus*, positive results  
270 were obtained when the steroid was supplied using food or implants, obtaining high percentages  
271 of feminization in both species (Vidal-López *et al.*, 2012, Carvalho *et al.*, 2014, Passini *et al.*,  
272 2016).

273 Histological evidence indicated that the fish used had begun to differentiate into males,  
274 supported with the appearance of the efferent duct, and an increase in the number and size of the  
275 primordial germinal cells. Therefore, we conclude that sex inversion was effective. Since the  
276 terms "sex inversion" and "sex reversal" frequently appear interchangeably in the literature, we  
277 considered it necessary to reexamine this topic in the light of sex manipulation in hermaphroditic  
278 species: initially, Nakamura and Takahashi (1973) described sex reversal for gonochoristic  
279 species as the time when fish gonads are sexually undifferentiated but are susceptible to the  
280 action of exogenous steroids. This was further discussed by Chan and Yeung (1983), defining the  
281 term as the transformation of an individual fish from one sex to another. Green *et al.* (1997)  
282 attempted to differentiate induction of sex change in undifferentiated and differentiated fish by  
283 arguing that the term "sex inversion" is defined as the process where the undifferentiated gonad is  
284 directed to a particular sex, and "sex reversal" as the induction of a differentiated gonad to  
285 become that of the opposite sex. In the case of hermaphroditic species, both terms stand, since  
286 sex change can be induced during both stages of gonadal development. This is supported by the  
287 successful sex inversion of juvenile sea bream, *Sparus aurata* (Condeça and Canario, 1999);  
288 common snook, *C. undecimalis* (Vidal-López *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014) and fat snook,  
289 *C. parallelus* (Carvalho *et al.*, 2014). While sex reversal has been documented for adult blue-  
290 spotted grouper, *Epinephelus fario* (Kuo *et al.*, 1988), black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*  
291 (Chang, *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1995), black sea bass, *Centropristis striata* L. (Benton and  
292 Berlinsky, 2006), three-spot wrasse, *Halichoeres trimaculatus* (Nozu, *et al.*, 2009), and adult fat  
293 snook (Passini *et al.*, 2016). Contrary to this, Piferrer (2001) mentioned that for some  
294 gonochoristic species, once the sexual differentiation process is advanced, or the gonads are  
295 mature, it is more difficult to change the sex and may become impossible in some cases.

296 An important aspect of this type of study is the identification of an effective dose and an  
297 optimal time of steroid application, with the purpose of optimizing resources. We did not assess  
298 different times for steroid application, but the results of Vidal-López *et al.* (2012) in *C.*  
299 *undecimalis* were considered, suggesting that more than 21 days of exposure produced high rates  
300 of feminization. Nevertheless, in the present study, the assessment of different dosages was  
301 necessary, and we determined that dosages of 50 and 60 mg E2 kg<sup>-1</sup> of food were highly efficient  
302 without compromising survival. The dose required for feminization of fish species is highly  
303 variable. Piferrer (2001) detailed successful feminization using estradiol in food with dosages

304 ranging from 1 mg kg<sup>-1</sup> in *Mugil cephalus* to 400 mg kg<sup>-1</sup> in *Poecilia reticulata*. The blackhead  
305 sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, can be feminized using as low as 4 mg kg<sup>-1</sup> of estradiol in  
306 the diet; however, this protocol requires five months of treatment (Chang and Lee, 1992).  
307 Strüssmann *et al.* (1996) obtained 100% females using 77 days of treatment with food  
308 impregnated with E2 at dosages of 20 mg kg<sup>-1</sup> of food in the pejerrey, *O. bonariensis*. In  
309 centropomids, Vidal-López *et al.* (2012) presented histological evidence of significant  
310 feminization of the gonads in *C. undecimalis* by feeding 50 mg E2 kg<sup>-1</sup> of food for 21 to 42 days.  
311 However, the reproductive viability of the females was not demonstrated. Likewise, complete  
312 sexual inversion was attained in adult males of this species, using implants at dosages ranging  
313 from 0.5 to 1.0 mg E2 kg<sup>-1</sup> of fish (Passini *et al.*, 2016). In a closely related but smaller species  
314 (*C. parallelus*), Carvalho *et al.* (2014) produced up to 100% females when 25 mg E2 kg<sup>-1</sup> of food  
315 was provided for 45 days. Unfortunately, in all cases, reproductive viability was not reported.

316 One important contribution of this investigation was the assessment of the treated fish at three  
317 different periods (30, 80, and 100 days) post-treatment, to observe morphological and structural  
318 changes in the development of the gonad. Based on the histological analyses of 93 sex-inversed  
319 females, no abnormal morphological or structural changes were observed during gonad  
320 development, indicating that the ovaries followed a “normal pattern” of development.  
321 Furthermore, the high survival rate of the fish kept for viability tests and the successful  
322 production of larvae support the well-being of the females. However, it is important to mention  
323 that some studies have reported that exposure to estrogenic compounds can induce abnormalities  
324 in behavior and the structure and morphology of the gonads (intersex organisms and structural  
325 anomalies) and other organs. For example, Islinger *et al.* (2003) reported ultrastructural changes  
326 in the livers and testes of zebrafish, *Danio rerio*; Flynn and Benfey (2007) found mottled livers,  
327 swollen kidneys, and reduced gonad size in shortnose sturgeons, *Acipenser brevirostrum*; and  
328 Hendry *et al.* (2003) detailed irreversible injuries in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*  
329 L. including spinal deformities and high mortality rates, after E2 treatment. One possible  
330 explanation of these anomalies in growth and development may be related to altered interactions  
331 between sex steroids, growth hormone, and thyroid hormones (de Jesus *et al.*, 1992; Lin *et al.*,  
332 1995) produced by the exogenous exposure to E2.

333 Growth was enhanced when juveniles were fed a diet containing 17β-estradiol. The highest  
334 dose of E2 resulted in the fastest growth, remaining significant for up to six months; however, all

335 fish reached the same size by the end of the study. Research supporting these findings indicate  
336 that orally administered E2 has significant growth-promoting effects in fish (Malison *et al.*, 1988;  
337 Satoh and Nimura, 1991; Hiroaki *et al.*, 1993; Blázquez *et al.*, 1998) perhaps because E2 can  
338 enhance growth through increased appetite, improved digestion, or increased absorption (Woo *et*  
339 *al.*, 1993). However, contrasting results have been published on the effects of E2 on fish growth;  
340 some researchers claim no effects (Matty and Cheema, 1978, Woo *et al.*, 1993), and others report  
341 detrimental effects (Goetz, 1979, Funk *et al.*, 1973, Johnstone *et al.*, 1978, Wang *et al.*, 2008). As  
342 mentioned above, these effects might be related to the altered interactions between sex steroids  
343 and growth hormone, particularly in gonochoric species. Conley and Walters (1999) highlighted  
344 the importance of balance between androgens and estrogens, which is essential for normal sexual  
345 development, reproductive function, and normal growth of both sexes in vertebrates.  
346 Undoubtedly, the expression and activity of the aromatase enzyme plays a fundamental role in  
347 maintaining this critical balance. In our study, the survival of *C. poeyi* was not affected by E2  
348 administration, indicating that this protandric species has the capability to process up to 60 mg of  
349 E2 per kilogram of food with no deleterious effects. Reports indicate that the negative effects of  
350 steroid administration on survival depend on a number of factors, with the most important being  
351 treatment timing, treatment intensity, and species (George and Pandian, 1996).

352 In the present study, successful feminization and reproductive viability of the females was  
353 achieved for the first time in *C. poeyi*. These are major accomplishments for snook aquaculture,  
354 since females currently used for larval production of large snooks are obtained from wild  
355 populations and require between three to four years after confinement to respond to hormonal  
356 induction (Ibarra-Castro *et al.*, 2011; Contreras-García, *et al.*, 2015). On top of this, broodstock  
357 management is also expensive and risky due to the large size of the females. The production of  
358 small amounts of larvae from the sex-reversed females (approximately 240,000 per female)  
359 provides a practical and manageable solution to handling millions of larvae during every  
360 spawning event.

### 361 **Acknowledgements**

362 This research is a component of the AquaFish Innovation Lab, which is supported in part by  
363 the US Agency for International Development (USAID CA/LWA No. EPP-A-00-06-0012-00),  
364 and in part by participating institutions. The AquaFish accession number is 1467. The opinions  
365 expressed herein are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the AquaFish

366 Innovation Lab or USAID. This study was also partially supported by the Juarez Autonomous  
367 University of Tabasco (UJAT) and CONACyT. The authors thank Moises González-Valencia for  
368 his technical assistance in preparation of histological material, Aaron Torrez-Martinez for his  
369 outstanding technical assistance in microscopic photography, and Allyse Ferrara for significant  
370 editorial improvements.

## 371 **References**

- 372 Aguilar, M., B.B. Coutino & R.P. Salinas. 1996. Manual General de Técnicas Histológicas e  
373 Histoquímicas. México, D. F.: Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias.
- 374 Alvarez-Lajonchère, L. & M.Y. Tsuzuki. 2008. A review of methods for *Centropomus* spp.  
375 (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin  
376 America. *Aquaculture Research* 39(7), 684-700.
- 377 Baroiller, J.F., Y. Guiguen & A. Fostier. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex  
378 Differentiation in fish. *Cellular Molecular Life Sciences* 55, 910-931.
- 379 Benton, C. B. & D.L. Berlinsky. 2006. Induced sex change in black sea bass. *Journal of Fish*  
380 *Biology*, 69, 1491–1503.
- 381 Beardmore, J.A., G.C. Mair & R.I. Lewis. 2001. Monosex male production in finfish as  
382 exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197, 283-301.
- 383 Blázquez, M., S. Zanuy, M. Carrillo & F. Piferrer. 1998. Structural and functional effects of early  
384 exposure to estradiol-17 $\beta$  and 17-ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost  
385 *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiology and Biochemistry* 18, 37–47.
- 386 Cerqueira, V.R. & M.Y. Tsuzuki. 2009. A review of spawning induction, larviculture, and  
387 juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and*  
388 *Biochemistry* 35, 17-28.
- 389 SAGARPA. 2017. Información estadística por especie y entidad. Available from:  
390 [http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/informacion\\_estadistica\\_por\\_especie\\_y\\_entidad](http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/informacion_estadistica_por_especie_y_entidad)  
391 (accessed 13 July 2017).
- 392 Conley, A.J. & K.W. Walters. 1999. Aromatization, in: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.),  
393 *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1 (pp. 280-291). New York, EE.UU. Academic Press.
- 394 Contreras-García, M.D.J., W.M. Contreras-Sánchez, U. Hernández-Vidal & A. Mcdonal-Vera.  
395 2015. Induced spawning of the common snook, *Centropomus undecimalis*, in captivity  
396 using GnRH-a implants. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2, 357-362.



397 Chan, S.T.H. & W.S.B. Yeung. 1983. 4 Sex control and sex reversal in fish under natural  
398 conditions. In Fish Physiology (Vol. 9, pp. 171-222). Academic Press.

399 Chang, C.F. & M.F. Lee. 1992. Involvement of estradiol 17 on the processes of natural and  
400 control sex reversal in protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). Conference  
401 presented. In Second International Symposium on Fish Endocrinology. St. Malo, France.

402 Chávez H.R. 1961. Estudio de una nueva especie de robalo del Golfo de México y redescrición  
403 de *Centropomus undecimalis* (Bloch). Ciencia 21(2), 75-83.

404 Chávez, H.R. 1963. Contribución al conocimiento de la Biología de los robalos, Chucumite y  
405 Constantino (*Centropomus undecimalis*) del Estado de Veracruz, México. Ciencia 22 (5),  
406 141-161.

407 Chávez, H.R. 1981. Marcado de robalo prieto, *Centropomus poeyi*, en la Cuenca del Papaloapan.  
408 Ciencia Pesquera 1(1): 17-26.

409 Chávez-Caballero, V., R. M. Loran-Núñez, M.G. Gómez-Ortiz, M. Garduño-Dionate & F. R.  
410 Martínez-Isunza. 2014. Robalo del Golfo de México *Centropomus undecimalis*,  
411 *Centropomus poeyi* y *Centropomus parallelus*, In: Beléndez-Moreno L.F.J., Espino-Barr  
412 E., Galindo-Cortes, G. Gaspar-Dillanes, M.T., Huidobro-Campos, L., Morales-Bojórquez,  
413 E. (Eds.), Sustentabilidad y pesca responsable en México evaluación y manejo. Instituto  
414 Nacional de Pesca, Mexico D.F., México, pp. 211-241.

415 Carvalho, C.V.A., G. Passini, W. de Melo Costa & V.R. Cerqueira. 2014. Feminization and  
416 growth of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed diets with different concentrations  
417 of estradiol-17 $\beta$ . Aquaculture International 22, 1391.

418 Carvalho, C.V.A., P. Passini, W.M.C. Costa, B.N. Vieira & V.R. Cerqueira. 2014. Effect of  
419 estradiol-17 $\beta$  on the sex ratio, growth and survival of juvenile common snook  
420 (*Centropomus undecimalis*). Acta Sci., Anim. Sci., 239–245.

421 Condeça, J. B. & A.V. Canario. 1999. The Effect of Estrogen on the Gonads and on In Vitro  
422 Conversion of Androstenedione to Testosterone, 11-Ketotestosterone, and Estradiol-17 $\beta$  in  
423 *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae). General and Comparative Endocrinology, 1(116), 59-  
424 72.

425 De Jesus, E.G., T. Hirano & Y. Inui. 1992. Gonadal Steroids Delay Spontaneous Flounder  
426 Metamorphosis and Inhibit T<sub>3</sub>-induced Fin Ray Shortening in vitro (Endocrinology).  
427 Zoological science, 9(3), 633-638.

428 Devlin, R.H. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an  
429 overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191-  
430 364.

431 Frisch, A. 2004. Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish.  
432 *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14, 481–499.

433 Flynn, S.R. & T. J. Benfey. 2007. Effects of dietary estradiol-17 $\beta$  in juvenile shortnose sturgeon  
434 (*Acipenser brevirostrum*), Lesueur. *Aquaculture* 270, 405-412.

435 Funk, J.D., E.M. Donaldson & H.M. Dye. 1973. Induction of precocious sexual development in  
436 female pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Canadian Journal of Zoology*, 51(5), 493-  
437 500.

438 George, T. & T.J. Pandian. 1996. Hormonal induction of sex reversal and progeny testing in the  
439 zebra cichlid *Cichlasoma nigrofasciatum*. *Journal of Experimental Zoology Part A:  
440 Ecological Genetics and Physiology* 275(5), 374-382.

441 Goetz, F.W., E.M. Donaldson, G.A. Hunter & H.M. Dye. 1979. Effects of estradiol-17 $\beta$  and 17 $\alpha$ -  
442 methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*.  
443 *Aquaculture* 17(4), 267-278.

444 Goudie, C. A., Redner, B. D., Simco, B. A., and Davis, K. B. (1983). Feminization of channel  
445 catfish by oral administration of steroid sex hormones. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 112, 670-  
446 672.

447 Green, B.W., K.L. Veverica & M.S. Fitzpatrick. 1997. Fry and Fingerling Production. *In* Egna  
448 H.S. and Boyd C.E. (Eds.), *Dynamics of pond aquaculture*. CRC Press. Boca Raton, FL,  
449 USA, pp. 215–243.

450 Grier, H.J. & R.G. Taylor. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook.  
451 *Journal of Fish Biology* 53, 521-542.

452 Grier, H.J. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook  
453 (*Centropomus undecimalis*) (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology* 234, 265-  
454 281.

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

457 Hiroaki, C., I. Kenji, H. Kazuo & Y. Kohei. 1993. Effects of dietary estradiol-17 $\beta$  on  
458 feminization, growth and body composition in the Japanese eel (*Anguilla japonica*).

459 Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 106(2), 367-371.

460 Huber, C.G., T.B. Grabowski, K.L. Pope & R. Patiño. 2014. Distribution and habitat associations  
461 of juvenile common snook in the lower Rio Grande, Texas. *Marine and Coastal Fisheries:  
462 Dynamics, Management and Ecosystem Science* 6, 170-180.

463 Hunter, G. & E. Donalson. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. *In:*  
464 Hoar, W.S., Donalson, E.M., (Eds.), *Fish Physiology and Reproduction*. Academic Press.,  
465 New York. Vol IX part 3, pp. 223-304.

466 Ibarra-Castro, L., L- Álvarez-Lajonchère, C. Rosas, I.G. Palomino-Albarrán, G.J. Holt & A.  
467 Sánchez-Zamora. 2011. GnRHa-induced spawning with natural fertilization and pilot-scale  
468 juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792).  
469 *Aquaculture* 319(3), 479-483.

470 Islinger, M., D. Wilimsky, A. Völkl & T. Braunbeck. 2003. Effects of 17 $\alpha$ - Ethinylestradiol on  
471 the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and  
472 testes in male zebrafish. *Aquatic Toxicology* 62, 85-103.

473 Johnstone, R., T.H. Simpson & A.F. Youngson. 1978. Sex reversal in salmonid culture.  
474 *Aquaculture* 13, 115-134.

475 Kim, D.S., Y.K. Nam & J.Y. Jo. 1997. Effect of oestradiol-17 $\beta$  immersion treatments on sex  
476 reversal of mud loach, *Misgurnus mizolepis* (Günther). *Aquaculture Research* 28(12), 941-  
477 946.

478 Kuo, C.M., Y.Y. Ting & S.L. Yeh. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted  
479 grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, 74(1-2), 113-126.

480 Lin, H.R., M. Lu, X.W. Lin, W.M. Zhang, Y. Sun & L.X. Chen. 1995. Effects of gonadotropin-  
481 releasing hormone (GnRH) analogs and sex steroids on growth hormone (GH) secretion  
482 and growth in common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*).  
483 *Aquaculture*, 135(1-3), 173-184.

484 Loran-Núñez, R.M., F. Martínez-Isunza, F., Valdez-Guzmán, A.J., M. Garduño-Dionate & E.R.  
485 Martínez-Loran. 2012. Reproducción y madurez sexual de robalo prieto (*Centropomus  
486 poeyi*) y robalo blanco (*C. undecimalis*) en el Sistema Lagunar de Alvarado, Veracruz  
487 (2005-2007). *Ciencia Pesquera* 20(1), 49-64.

488 Malison, J.A., T.B. Kayes, B.C. Wentworth & C.H. Amundson. 1988. Growth and feeding  
489 responses of male versus female yellow perch (*Perca flavescens*) treated with estradiol-

490 17 $\beta$ . Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 45(11), 1942-1948.

491 Matty, A.J. & I.R. Cheema. 1978. The effect of some steroid hormones on the growth and protein  
492 metabolism of rainbow trout. Aquaculture 14(2), 163-178.

493 Meijide, F.J., F.L. Lo Nostro & G.A. Guerrero. 2005. Gonadal Development and Sex  
494 Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light-  
495 and Electron-Microscopic Study. Journal of Morphology 264, 191–210.

496 Nakamura, M. 1984. Effects of estradiol-17 $\beta$  on gonadal sex differentiation in two species of  
497 salmonids, the masu salmon, *Oncorhynchus masou*, and the chum salmon, *O. keta*.  
498 Aquaculture. 43, 83-90.

499 Nakamura, M. & H. Takahashi. 1973. Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica* with  
500 special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing feminization of  
501 genetic fishes. Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ. 24, 1 – 13

502 Nakamura, M., T. Kobayashi, X.T. Chang & Y. Nagahama. 1998. Gonadal sex differentiation in  
503 teleost fish. Journal of Experimental Zoology 281, 362–372.

504 Nozu, R., Y. Kojima & M. Nakamura 2009. Short term treatment with aromatase inhibitor  
505 induces sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. General and  
506 comparative endocrinology, 161(3), 360-364.

507 Omoto, N., M. Maebayashi, E. Mitsuhashi, K. Yoshitomi, S. Adachi & K. Yamauchi. 2002.  
508 Effects of estradiol-17- $\beta$  and 17- $\alpha$  methyltestosterone sex differentiation in F2 hybrid  
509 sturgeon. Fisheries Science 68, 1047-1054.

510 Pandian, T.J. & S.G. Sheela. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture 138,  
511 1-22.

512 Passini, G., C.C. Vaz Avelar, S.F. Carneiro & C. Ronzani-Cerqueira. 2016. Induction of sex  
513 inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- $\beta$  oestradiol  
514 implants. Aquaculture Research 47, 1090–1099.

515 Patiño, R. 1997. Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous  
516 Chemicals. The Progressive Fish Culturist 59, 119-127.

517 Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish.  
518 Aquaculture 197, 229-281.

519 Popma, J. T. and W. Green. 1990. Sex reversal of tilapia in earthen ponds. Research and  
520 development Series. 35:1–15.

521 Saillant, E., A. Fostier, B. Menu, P. Haffray & B. Chatain. 2001. Sexual growth dimorphism in  
522 sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 202, 371-387.

523 Satoh, H. & Y. Nimura. 1991. Growth promotion in Japanese eel by the oral administration of an  
524 estrogen (diethylstilbestrol). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 21-27.

525 Silva, C.P., M. Otero & V. Esteves. 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid  
526 hormones from water: a review. *Environmental Pollution*, 165, 38-58.

527 Strüssmann, C.A. & M. Nakamura. 2002. Morphology, endocrinology, and environmental  
528 modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Physiology and Biochemistry*,  
529 26: 13. <https://doi.org/10.1023/A:1023343023556>

530 Strüssmann, C.A., F. Takashima & K. Toda. 1996. Sex differentiation and hormonal feminization  
531 in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquaculture* 139, 31-45.

532 Taylor R.G., J.A. Whittington, H.J. Grier & R.E. Crabtree. 2000. Age, growth, maturation, and  
533 protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and  
534 west coasts of south Florida. *Fishery Bulletin* 98, 612-624

535 Tucker, J.W. 2003. Snook culture. *World Aquaculture Society Magazine* 34(4), 42-46.

536 UN Food Agric. Organ. (FAO). 2011. Review of the State of World Marine Fishery Resources-  
537 Western Central Atlantic. Rome: FAO. Available from:  
538 <http://firms.fao.org/firms/resource/11842/en> (accessed 13 October 2017).

539 Vidal-López, J.M., C.A. Álvarez-González, W.M. Contreras-Sánchez, R. Patiño, A.A.  
540 Hernández-Franyutti, U. Hernández-Vidal & R. Martínez-García. 2012. Feminización de  
541 juveniles del robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch 1792) usando 17- $\beta$ -estradiol.  
542 *Revista de Ciencias Marinas y Costeras* 4, 83-93.

543 Wang, H.P., Z. Gao, B. Beres, J. Ottobre, G. Wallat, L. Tiu & H. Yao. 2008. Effects of estradiol-  
544 17 $\beta$  on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish  
545 *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture* 285(1), 216-223.

546 Woo, N.Y.S., A.S.B. Chung & T.B. Ng. 1993. Influence of oral administration of estradiol-17 $\beta$   
547 and testosterone on growth, digestion, food conversion and metabolism in the  
548 underyearling red sea bream, *Chrysophrys major*. *Fish physiology and biochemistry* 10(5),  
549 377-387.

550 Yanes-Roca, C., N. Rhody, M. Nystrom & K.L. Main. 2009. Effects of fatty acid composition  
551 and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook

552 (Centropomus undecimalis). Aquaculture 287, 335-340.  
553 Zarza, E.A., J.M. Berruecos, C. Vázquez & P. Álvarez. 2006. Cultivo experimental de robalo  
554 Centropomus undecimalis (Bloch, 1792) y Chucumite Centropomus parallelus (Poey,  
555 1860) (Perciformes: Centropomidae) en agua dulce en un estanque de concreto en  
556 Alvarado, Veracruz, México. Veterinaria Mexicana 37(3), 327-333.  
557

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

Table 1. Average values for weight and total length ( $\pm$  SE) of *C. poeyi* juveniles treated with 0, 40, 50 and 60 mg of E2 per kg of food (n = 30) at different times post treatment (DPT). Survival was 100% in all treatments. Different letters indicate statistical significant differences ( $p < 0.05$ ).

TREATMENT E2 (mg/kg)	0 DPT MEAN ( $\pm$ SE)	30 DPT MEAN ( $\pm$ SE)	180 DPT MEAN ( $\pm$ SE)	300 DPT MEAN ( $\pm$ SE)
0	33.12g $\pm$ 1.43 g <sup>a</sup> 158.97 $\pm$ 2.53 mm <sup>a</sup>	35.93 $\pm$ 0.96 g <sup>a</sup> 164.90 $\pm$ 1.22 mm <sup>a</sup>	49.18 $\pm$ 0.35 g <sup>a</sup> 173.10 $\pm$ 1.66 mm <sup>a</sup>	175.03 $\pm$ 1.93 g <sup>a</sup> 270.60 $\pm$ 1.43 mm <sup>a</sup>
40	43.98 $\pm$ 2.25 g <sup>ab</sup> 174.27 $\pm$ 3.09 mm <sup>b</sup>	50.34 $\pm$ 1.93 g <sup>ab</sup> 183.60 $\pm$ 2.34 mm <sup>b</sup>	57.48 $\pm$ 0.30 g <sup>b</sup> 198.30 $\pm$ 0.54 mm <sup>b</sup>	179.97 $\pm$ 1.56 g <sup>a</sup> 272.00 $\pm$ 1.67mm <sup>a</sup>
50	46.66 $\pm$ 1.75 g <sup>b</sup> 175.63 $\pm$ 2.85 mm <sup>b</sup>	54.89 $\pm$ 2.33 g <sup>b</sup> 187.20 $\pm$ 1.78 mm <sup>b</sup>	57.93 $\pm$ 0.33 g <sup>b</sup> 195.37 $\pm$ 1.53 mm <sup>b</sup>	178.10 $\pm$ 0.97 g <sup>a</sup> 282.6 $\pm$ 2.32 mm <sup>a</sup>
60	47.47 $\pm$ 1.71 g <sup>b</sup> 174.18 $\pm$ 2.95 mm <sup>b</sup>	55.46 $\pm$ 1.17 g <sup>b</sup> 184.70 $\pm$ 184.67 mm <sup>b</sup>	58.80 $\pm$ 0.41 g <sup>b</sup> 215.57 $\pm$ 1.84 mm <sup>c</sup>	193.73 $\pm$ 1.02 g <sup>a</sup> 279.3 $\pm$ 1. 86 mm <sup>a</sup>

Table 2. Average values for weight and total length ( $\pm$  SE) of *C. poeyi* juveniles treated with 0, 10, 20 and 30 mg of E2 per kg of food (n = 60) at different times post treatment (DPT). Survival was 100% in all treatments. Different letters indicate statistical significant differences ( $p < 0.05$ ).

TREATMENT E2 (mg/kg)	0 DPT MEAN ( $\pm$ SE)	30 DPT MEAN ( $\pm$ SE)	180 DPT MEAN ( $\pm$ SE)	300 DPT MEAN ( $\pm$ SE)
0	13.06 $\pm$ 0.17 g <sup>a</sup> 81.79 $\pm$ 1.12 mm <sup>a</sup>	17.19 $\pm$ 0.24 g <sup>a</sup> 85.93 $\pm$ 0.96 mm <sup>a</sup>	35.13 $\pm$ 1.35 g <sup>a</sup> 189.22 $\pm$ 2.93 mm <sup>a</sup>	40.02 $\pm$ 1.36 g <sup>a</sup> 192.11 $\pm$ 5.39 mm <sup>a</sup>
10	13.93 $\pm$ 0.13 g <sup>a</sup> 91.13 $\pm$ 1.07 mm <sup>b</sup>	18.36 $\pm$ 0.38 g <sup>a</sup> 98.12 $\pm$ 1.15 mm <sup>b</sup>	44.32 $\pm$ 2.49 g <sup>b</sup> 197.87 $\pm$ 4.59 mm <sup>b</sup>	48.32 $\pm$ 1.59 g <sup>b</sup> 209.53 $\pm$ 2.02 mm <sup>b</sup>
20	13.98 $\pm$ 0.12 g <sup>a</sup> 91.63 $\pm$ 0.95 mm <sup>b</sup>	18.72 $\pm$ 0.40 g <sup>a</sup> 99.33 $\pm$ 2.47mm <sup>b</sup>	61.88 $\pm$ 1.53 g <sup>c</sup> 207.00 $\pm$ 4.52 mm <sup>b</sup>	70.72 $\pm$ 0.89 g <sup>c</sup> 237.00 $\pm$ 2.35 mm <sup>c</sup>
30	13.86 $\pm$ 0.09 g <sup>a</sup> 91.83 $\pm$ 0.62 mm <sup>b</sup>	18.47 $\pm$ 0.25 g <sup>a</sup> 99.23 $\pm$ 2.45 mm <sup>b</sup>	63.37 $\pm$ 0.86 g <sup>c</sup> 211.94 $\pm$ 1.84 mm <sup>c</sup>	73.59 $\pm$ 1.31 g <sup>c</sup> 257.50 $\pm$ 2.75 mm <sup>c</sup>

Figure 1. Characteristics of *C. poeyi* ovaries. (A) Anatomical position and macroscopic appearance of ovaries from females obtained after E2 treatment. (B) Microscopic view of a complete transverse section of an ovary. Liver (L); Gas bladder (Gb); Ovary (Ov); ovary wall (Ow); lamellae (LM); primary growth oocytes (PG); lumen (Lu). Hematoxylin and eosin.

Figure 2. Characteristics of *C. poeyi* testes. (A) Anatomical position and macroscopic appearance of the testes from control group males. (B) Microscopic view of a complete transverse section of a testis. Liver (L); Gas bladder (Gb); testis (T); Efferent duct (ed); sperm (sp); tunica albuginea (ta). Hematoxylin and eosin.

Figure 3. Average cumulative percent ( $\pm$  Standard Error) of *C. poeyi* females obtained in experiment I for the control and treatments fed high dosages of E2. Different color bars indicate percent females at each sampling time for a particular treatment. Different letters indicate statistical significant differences between treatments (ANOVA,  $P < 0.05$ ).  $n=18$  for each treatment. DPT= Days post treatment

Figure 4. Unrestricted lobular testes from *C. poeyi* obtained from males of the control group. Details from transverse section of testes sampled at 60 (A), 180 (B) and 300 (C) days post treatment (100x; 40x and 10x, respectively). Efferent duct (ed); cysts (cy); spermatogonia (sg); sperm (sp); tunica albuginea (ta); blood vessels (bv); connective tissue (ct); lobules (lo). Hematoxylin and eosin.

Figure 5. Average cumulative percent ( $\pm$  Standard Error) of *C. poeyi* females obtained in the experiment with 0, 10, 20 and 30 mg of E2 per kg of food. Different.



color bars indicate percent females at each sampling time for a particular treatment. Different letters indicate statistical significant differences between treatments (ANOVA,  $P < 0.05$ ).  $n=27$  for each treatment. DPT= Days post treatment

Figure 6. Cystovarian ovaries from *C. poeyi* obtained from E2-treated organisms. Details from transverse cuts of ovaries sampled at 60 (A), 180 (B) and 300 (C) days post treatment (10x; 40x and 10x, respectively). Ovarian cavity (Oc); lamellae (l); Primary growth oocyte during multiple nucleoli stage (PGmn); germinal epithelium (ge); ovarian wall (ow). Hematoxylin and eosin.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

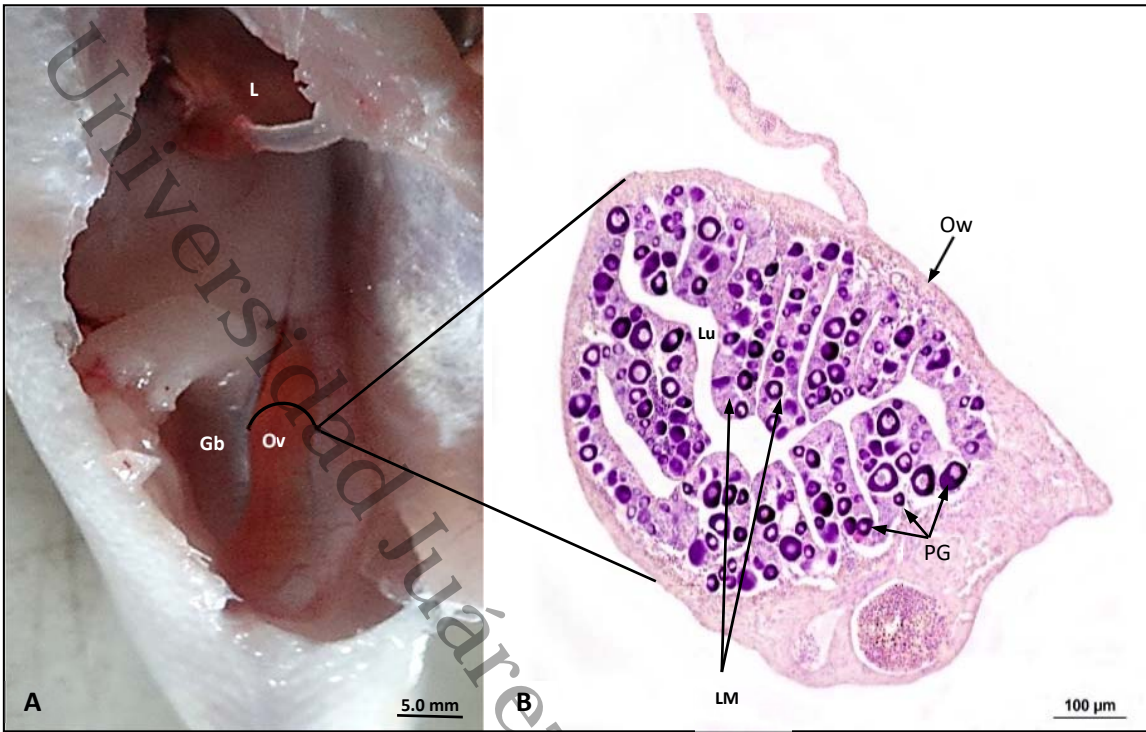


Figure 1.

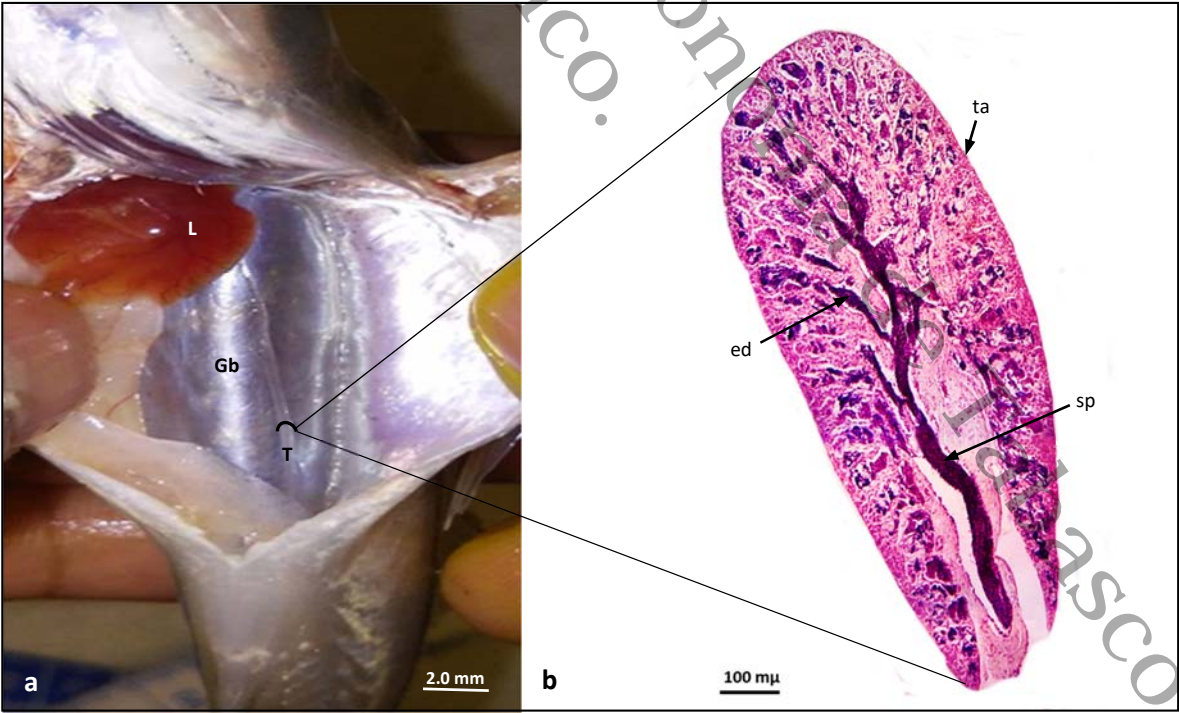


Figure 2.

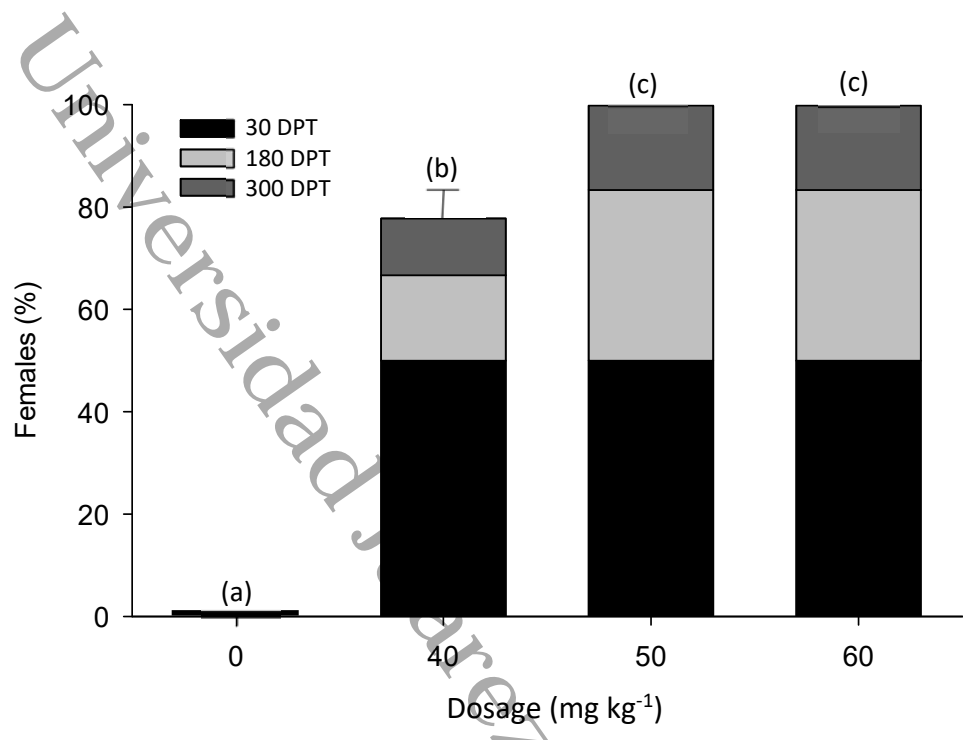


Figure 3.

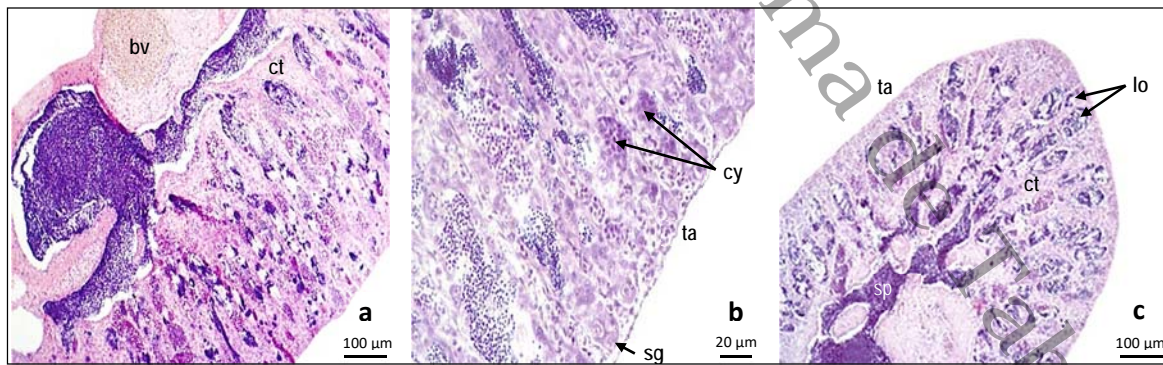


Figure 4.

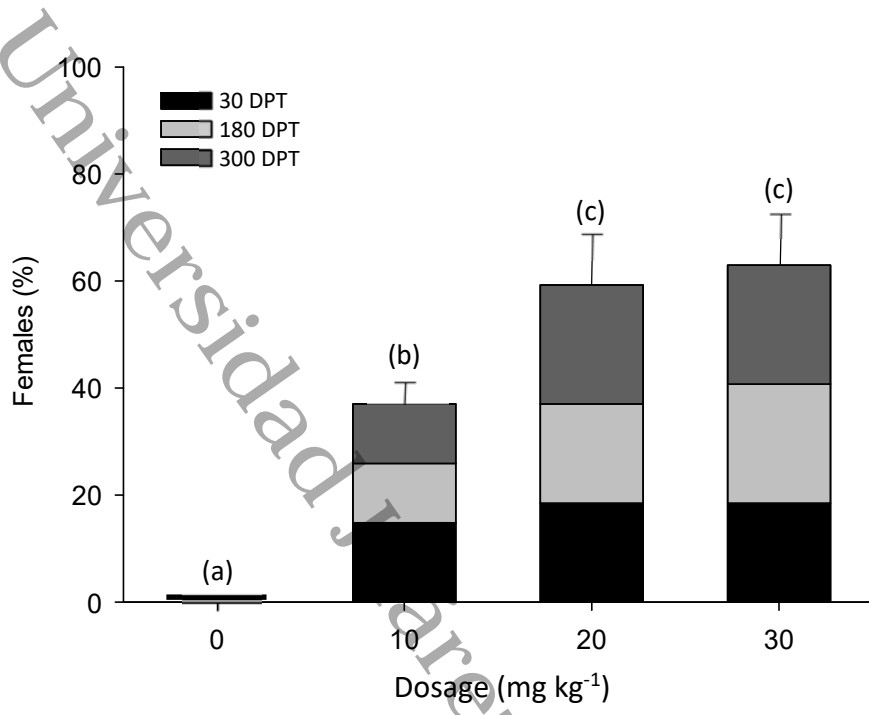


Figure 5.

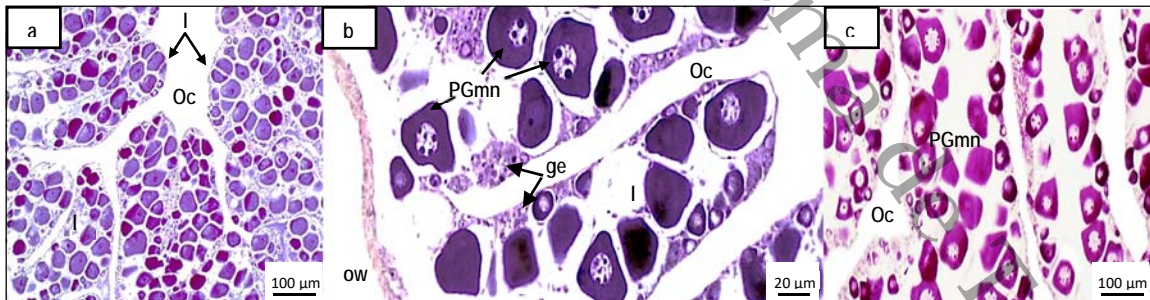


Figure 6.

## **GUÍA PARA AUTORES**

### **GENERAL PUBLISHING INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS**

*Latin American Journal of Aquatic Research* - LAJAR is an “Open Access” journal that publishes in English language, original research articles, reviews and short communications on aquatic science, which contain results of research conducted in aquaculture or in oceanic and coastal marine waters of Latin America.

#### **Types of manuscripts**

LAJAR publishes research articles, review articles and scientific short communications.

**Research Article.** An article should contain an abstract (250 words maximum) and keywords, followed by a text with a defined structure, details of which are given below. Preferably, the manuscript should not exceed 30 pages, including figures and tables.

**Review Article.** Reviews should contain an abstract (250 words maximum) on the state of knowledge of a specific topic of research and keywords, followed by a continuous freestyle text. This manuscript should not exceed 30 pages, including figures and tables.

**Short Communication.** These are short papers on a specific topic that describe preliminary results, new findings or new methodologies. Communications must include an abstract (200 words maximum) and keywords. Different segments of the paper (introduction, methodology, results and discussion) should be written continuously in a single section. Length of the manuscript should be under 10 pages, including figures and tables.

#### **Article structure**

Structure of the manuscript should follow the following order:

**Title:** Brief and descriptive. A running head of no more than 50 characters should be provided.

**Author names and affiliation:** Indicate name, last name (paternal only, when applicable), affiliation, address, and e-mail address of the corresponding author.

**Abstract:** Must contain a maximum of 250 words, indicating purpose, main results or findings and conclusions presented in the manuscript.

**Keywords:** Maximum of six, arranged in order of importance.

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Conclusions (optional)

Acknowledgements

Citations: Consider only published works or in press. References must be ordered chronologically indicating first author's last name and year of publication (e.g., Muñoz *et al.*, 2009; Alvarez, 2010; Johnson & Smith, 2013; Palmer, 2015a,b).

References: Include only documents mentioned in the text, references must be organized alphabetically based on the first author's last name. In the case of two or more authors, initials must be indicated after their last names; use a comma to separate each author.

Examples of different formats for different types of frequently used references:

a) References of articles cited in the text must indicate: author(s), year of publication, article title, complete name of the journal, volume (number between parentheses) and page numbers. Add DOI number if pertinent, to facilitate internet search.

Huang, D. & Roy, K. 2013. Anthropogenic extinction threats and future loss of evolutionary history in reef corals. *Ecology and Evolution*, 3(5): 1-10. doi: 10.1002/ece3.527

Andrade, I., Sangrá, P., Hormazábal, S.E. & Correa-Ramírez, M.A. 2014. Island mass effect in the Juan Fernández Archipelago (33°S), Southeastern Pacific. *Deep-Sea Research I*, 84: 86-99. doi: 10.1016/j.dsr.2013.10.009

b) Book references must indicate: Author(s), year of publication, book title, editorial, city.

Randall, J.E. & Cea, A. 2011. *Shore fishes of Easter Island*. University of Hawaii Press, Honolulu.

c) Articles published in books must indicate: Author(s), year of publication, article title, book title, editorial, city, number of pages.

Andersen, R.A. & Kawachi, M. 2005. Traditional microalgae isolation techniques. In: Andersen, R.A. (Ed.). *Algal culturing techniques*. Academic Press, New York, pp. 83-89.

d) Articles published on the Internet must indicate: Author(s), year of publication, article title, full URL, date of last review.

R Core Team. 2016. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. [<http://www.R-project.org>]. Reviewed: 12 June 2018.

## Figures and tables

Graphics, maps, schemes, drawings or photographs must be referred to as Figure, abbreviated in the text as Fig.

Figures should be numbered consecutively using Arabic numerals; captions should be self-explanatory. Texts and symbols inside a figure must be written in Arial characters and have a size that guarantees legibility in case of downsizing. If the figure includes more than one image, these must be characterized with lowercase letters (e.g., a, b, c, etc.). Figures should be preferably sized as close to the final version as possible. Figures can be a maximum of 15 cm wide by 21 cm high (including caption).

Images (photographs) must be in JPG or PNG format (black and white or color) and be in high resolution (keep to a minimum of 300 dpi) considering an adequate range of tones and contrasts.

Tables in Excel or Word must be numbered consecutively with Arabic numerals. Captions should be self-explanatory. The heading of each column must express clearly its content and measurement units.

## Submission

- Manuscripts are to be submitted exclusively online on the Journal's website ([lajar.ucv.cl](http://lajar.ucv.cl)) (Online Submissions). The manuscript must be written in English, in Microsoft Word format, in Times New Roman size 12, with 1.5 spacing, on letter size paper.
- Tables and figures should be included at the end of the text.
- Authors should suggest a minimum of six potential reviewers of recognized competence in the area of knowledge of the proposed, indicating name and e-mail address.
- Authors must ensure that any submitted article has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere.

## Review Process

Manuscripts are to be submitted exclusively online on the Journal's website ([lajar.ucv.cl](http://lajar.ucv.cl)). Reception of articles will be acknowledged by e-mail to the corresponding author. Before its acceptance, all submitted manuscripts will be assessed by the editor and co-editor in order to determine if they are suitable for the Journal. Documents considered as adequate will enter an evaluation process led by

associate editors with recognized competence in the proposed area of knowledge, considering the opinion of at least two or three international researchers, considered experts in the proposed subject of the manuscript.

Manuscripts will be evaluated as excellent, good, regular or poor, according to the following aspects:

- Originality.
- Relevance to scientific knowledge in aquatic research.
- Formal Aspects: Correct and understandable language. Title and abstract should be sufficiently informative. References must be properly cited.
- Background: Theoretical background is adequate, with clear hypothesis and objectives.
- Methodology: Materials and methods are appropriate and adequately described.
- Results: Data is concise and sufficient. The use of statistics analysis is appropriate.
- Figures: Figures and/or photographs are clear and of good quality, and include only data essential for its comprehension.
- Discussion: Is clear and correctly interpreted.
- References: 70% or more of the references are up to date.

The reviewed article may be: accepted; acceptable with minor changes; acceptable with major changes; or rejected (doesn't meet journal's editorial standards, preliminary results, plagiarism).

If the paper is accepted with minor or major changes, authors will be informed and will have a maximum of 60 days to reply all observations and return a new, corrected version of the manuscript to the corresponding associate editor for a final review.

### **MANUSCRIPTS ACCEPTED FOR PUBLICATION**

Once accepted for publication, authors must forward the final text with all corrections made and accepted by the assigned associate editor.

### **GALLEY PROOFS**

Proofs will be sent by the editor to the corresponding author for a final review. Final correction of the manuscript is the exclusive responsibility of the corresponding author and any modification must be informed to the editor of the journal.



## **PUBLICATION FEE**

Papers accepted are subjected to a publication charge of USD350. This fee is independent of the length of the manuscript and the number of figures and tables. This amount must be paid once the corresponding author has received the print proofs.

## **SUBMISSION PREPARATION CHECKLIST**

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. I have the Chief-Editor presentation letter, signed by corresponding autor.
2. I have the 6 experienced reviewer names required (Name, address, and email), NOTE: you must use the field below entitled "Coments to editor / Reviewer proposal" at the end of this page.
3. The file is in MS Word file type, interlined text at 1.5, Font: Times New Roman 12 pt.
4. I have the short title in the main language of the article.
5. The article title is included in English.
6. The article abstract length is under 250 words, in English, and highlights results and obtained discoveries.
7. I added the 6 keywords required in English ordered by relevance.
8. Article contents are ordered in the following chapters, i.e.
  - Introduction
  - Materials and methods
  - Results
  - Discussion
  - Conclusions (optional)
  - Aknowledgement
  - References
9. Tables are included in Excel or Word File Type, and their leyends are in English.
10. Figures have 300 dpi as a minimum resolution, placed at the end of the article text with their leyends in English written beneath it, and in the following file types; CorelDRaw, Excel, Surfer, Sigma plot, JPG or PNG.
11. I accept to pay USD350,00 once upon I receive the galley proofs of my article.

# CAPITULO 4

Reversión sexual de machos adultos funcionales de *Centropomus*  
*poeyi* usando implantes de 17- $\beta$  estradiol

Para ser sometido a:

Latin American Journal of Aquatic Research

1 **Reversión sexual de machos adultos funcionales de *Centropomus poeyi***  
2 **usando implantes de 17-β estradiol**

3  
4  
5 Juan Manuel Vidal-López<sup>1</sup>, Wilfrido M. Contreras-Sánchez<sup>1\*</sup> y A. A. Torres-  
6 Martínez<sup>1</sup>.

7  
8 <sup>1</sup>Laboratorio de Acuicultura Tropical. División Académica de Ciencias Biológicas,  
9 Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Km 0.5 Carretera Villahermosa,  
10 Tabasco, C. P. 86040

11  
12 \*Autor de correspondencia: Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica  
13 de Ciencias Biológicas. Km 0.5, Carretera Villahermosa-Cárdenas, Entronque a  
14 Bosques de Saloya. Villahermosa, Centro, Tabasco. CP 86039. Tel. (993) 358 1500  
15 ext. 6425. Email address: [contrerw@hotmail.com](mailto:contrerw@hotmail.com)

16

17

18

19

20

21

22

23

24

## 25 **Resumen**

26 El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de implantes de colesterol con  
27 dosis diferentes (0, 1, 2 y 3 mg kg<sup>-1</sup>) de E2 en machos adultos funcionales para  
28 inducir la reversión sexual en *C. poeyi* y la producción de hembras a tallas más  
29 pequeñas de fácil manipulación y adaptadas al manejo en cautiverio. Los resultados  
30 obtenidos muestran diferencias significativas en el porcentaje de hembras obtenidas  
31 en los tratamientos ( $\chi^2$ ;  $P < 0.001$ ). Con implantes de 2 y 3 mg de E2 kg<sup>-1</sup> de pez es  
32 posible obtener hasta 100 % de hembras; mientras que con implantes de 1 mg de  
33 E2 kg<sup>-1</sup> de pez los porcentajes son ligeramente menores con un 87 % de hembras.  
34 En los peces del grupo control se obtuvo un porcentaje de 100% de machos. Al final  
35 del experimento se observaron diferencias estadísticas altamente significativas en  
36 el crecimiento de los peces. Los peces tratados con E2 tuvieron un crecimiento  
37 mayor al grupo control y el grupo que recibió 3 mg de E2 kg<sup>-1</sup> obtuvo el máximo  
38 crecimiento. La sobrevivencia en todos los tratamientos fue de 100 %. No se  
39 observan anomalías en las gónadas de los peces expuestos a E2 vía implantes,  
40 pues aquellos revertidos exitosamente presentaron ovarios en desarrollo. Los  
41 resultados en el potencial sexual de hembras obtenidas con implantes de E2 son  
42 altos ya que se pueden obtener hembras viables a tallas pequeñas. Todo indica a  
43 que esta especie presenta hermafroditismo protándrico y de manera natural, las  
44 hembras se presentan a tallas y pesos grandes. Por ello, las hembras obtenidas  
45 permiten un mejor control de la reproducción al disponer de una cantidad menor de  
46 gametos.

47

48 **Palabras claves:** *Centropomus poeyi*, estradiol, implantes

## 49 **Introducción**

50 El hermafroditismo es una condición de origen polifilético en peces, se ha  
51 documentado en 27 familias y siete órdenes que representan aproximadamente un  
52 dos por ciento de especies conocidas de peces teleósteos (Avisé y Mank, 2009;  
53 Sadovy y Liu, 2008; Wootton y Smith, 2015; García *et al.*, 2016). Esta condición es  
54 rara en los vertebrados, esencialmente está ausente en condriictios, aves y  
55 mamíferos, pero se produce en un número amplios de familias de peces teleósteos.  
56 El hermafroditismo hace referencia a la expresión en la función reproductiva tanto  
57 masculina y femenina en un mismo organismo, ya sea de manera simultánea,  
58 secuencialmente o serial (Sadovy y Liu, 2008; Pandian, 2010, 2011; 2012; Wootton  
59 y Smith, 2015). El hermafroditismo se encuentra presente en la familia  
60 Centropomidae donde al menos se tiene certeza de su condición en *Centropomus*  
61 *undecimalis* (Taylor *et al.*, 2000; Grier y Taylor, 1988; Grier, 2000), en *Centropomus*  
62 *medius* (Maldonado-García *et al.*, 2005) y recientemente demostrada en  
63 *Centropomus poeyi* (Vidal-López, *en prensa*). En el resto de las especies que  
64 integran esta familia se especula que el hermafroditismo está presente, pero no se  
65 tiene certeza de que así ocurra. Los estudios sobre el proceso natural de reversión  
66 sexual en peces teleósteos han generado discrepancia alrededor de las causas que  
67 originan la reversión sexual en los peces hermafroditas. Algunos estudios sugieren  
68 que la causa próxima al cambio de sexo parece ser un cambio en el patrón de la  
69 esteroidogénesis gonadal (Frisch, 2004). En particular, el cambio sexual implica  
70 variaciones recíprocas en las concentraciones de 17- $\beta$  estradiol (E2), que tiende a  
71 promover 'feminización' (por ejemplo, ovogénesis) y 11-cetotestosterona (11KT),  
72 que tiende a promover la "masculinidad" (por ejemplo, comportamiento agresivo)

73 (Nakamura et al., 1989; Cardwell y Liley, 1991; Cochran y Grier, 1991; Bhandari et  
74 al., 2003). Para explicar esta estrategia reproductiva, en algunas especies  
75 hermafroditas se ha documentado que el modelo tamaño-ventaja ha sido muy  
76 exitoso para explicar los motivos del cambio de sexo. Los argumentos sobre este  
77 modelo sugieren que aquellos individuos que alcancen una talla mayor a menor  
78 edad tendrán un mayor éxito reproductivo durante su vida (Ghiselin, 1969; Warner  
79 et al., 1975). Esto se traduce en machos a una mayor capacidad para defender  
80 territorios y reunir grupos de hembras y en las hembras una mayor capacidad para  
81 alojar ovocitos previo al desove. Estas características han sido explotadas en la  
82 acuicultura con fines comerciales, pues la reversión sexual inducida mediante la  
83 administración oral y por implantes busca potenciar las ventajas de un sexo o el  
84 otro; ya sea produciendo mayor cantidad de carne o mayor cantidad de gametos.  
85 En el presente estudio se pretende producir lotes de hembras pequeñas a partir de  
86 machos adultos jóvenes, pues el manejo de reproductores de *C. poeyi* es  
87 complicado debido a que las hembras varían en pesos de entre cinco y diez kilos.  
88 Esta situación genera que el manejo de reproductores sea costoso, además de  
89 implicar mayores riesgos en el mantenimiento de organismos tan grandes en  
90 cautiverio.

## 91 **Materiales y métodos**

92 *Obtención de organismos y crianza de los organismos.* Los organismos se  
93 obtuvieron de un desove inducido mediante el empleo de la hormona sintética  
94 LHRHa de los organismos resultantes, se seleccionaron aleatoriamente 150  
95 individuos, los cuales se mantuvieron en tanques de 500 L con salinidad inicial de  
96 30 ppt y aireación constante, posteriormente, los juveniles fueron adaptados a agua

97 dulce y se mantuvieron en tanques de 2000 L en un sistema con cambios parciales  
98 de agua. Los peces fueron alimentados con alimento comercial para peces marinos  
99 marca Europa® (55 % de proteína, 14% de lípidos, 8% de ceniza, 0.2% de fibra).  
100 Los ejemplares experimentales (120) fueron seleccionados al azar de un total de  
101 150, teniendo tres años de edad al inicio de la fase experimental. La condición  
102 gonadal previa al experimento se determinó mediante presión manual en la región  
103 abdominal, comprobándose la condición de machos adultos (extracción de muestra  
104 de semen fluido).

105 *Diseño experimental.* Se empleó un experimento de un factor completamente  
106 aleatorizado con cuatro tratamientos (implantes de 0, 1, 2 y 3 mg E2 kg<sup>-1</sup> de pez).  
107 Cada tratamiento fue por triplicado y en cada unidad experimental se sembraron  
108 cinco machos adultos de *C. poeyi* con tallas promedio inicial de 209.95 mm ( $\pm$  23.91)  
109 de longitud total y 242.21 g ( $\pm$ 21.63) de peso. El experimento duró 90 días y se  
110 realizó en un sistema de recirculación cerrado, conformado por 12 tanques  
111 circulares de 2000 L de capacidad. Los tanques fueron llenados con agua dulce y  
112 mantenida bajo filtración mecánica y química durante todo el experimento. El agua  
113 fue filtrada empleando un filtro casero para eliminar cualquier residuo de E2 y  
114 sedimentos. El filtro se construyó empleando un tanque cilíndrico de plástico de 200  
115 L (60 cm de diámetro, 90 cm de altura) conteniendo tres capas de material filtrante:  
116 a) 5 kg de carbón activado granular (Silva et al., 2012) contenido en una bolsa de  
117 malla plástica (1 mm luz de malla); b) 10 kg de concha de ostión triturada, y c) 10  
118 kg de grava fina. El agua circuló por gravedad a un reservorio de 5,000 L y  
119 recirculada a los tanques experimentales empleando una bomba centrífuga de 1.5  
120 HP equipada con un filtro de arena (Jacuzzi™, L190, Little Rock, AR, USA). Los

121 desperdicios acumulados en los tanques de peces fueron sifoneados diariamente y  
122 se realizó un recambio semanal del 30% del volumen total de agua.

123 *Alimentación de los especímenes.* Durante el experimento, los peces fueron  
124 alimentados a saciedad aparente con horarios de 8:00 am, 11:00 am, 14:00 pm y  
125 17:00 pm empleándose alimento comercial para peces marinos marca Europa® (55  
126 % de proteína).

127 *Elaboración y colocación de implantes.* Para la elaboración de los implantes que  
128 contenían la hormona se siguió la metodología propuesta por Álvarez-Lajonchere y  
129 Hernández-Mollejón, (2001), la cual consiste básicamente en preparar un  
130 comprimido a base de colesterol y celulosa en una proporción 95:100 y añadir la  
131 dosis deseada de 17- $\beta$  estradiol. Los implantes fueron colocados ventralmente en  
132 la cavidad peritoneal, empleando una aguja 15 G.

133 *Evaluación del crecimiento, sobrevivencia y análisis histológico.* Al final de los  
134 tratamientos, se determinó el peso de los organismos con una balanza analítica  
135 (Ohaus®, Pine Brook, NJ, USA) con precisión de 0.001 g y la longitud total con un  
136 ictiómetro convencional con precisión de 0.1 cm. Las biometrías se realizaron a  
137 todos los organismos de cada tratamiento. La sobrevivencia se evaluó contando  
138 cada uno de los peces de cada unidad experimental. Para determinar la proporción  
139 de sexos se tomó una muestra aleatoria de cuatro peces de cada réplica. Los peces  
140 seleccionados fueron sacrificados con sobredosis de metasulfonato de tricafna (MS-  
141 222) a razón de 1 g/L. Posteriormente, fueron disectados y se extrajeron las  
142 gónadas de cada organismo, las cuales fueron fijadas por 24 h en solución de Bouin  
143 y luego mantenidas en alcohol etílico al 50%. Para el procesamiento de las muestras  
144 se siguió la técnica histológica convencional con tinción, basada en hematoxilina-



145 eosina (H-E) (Aguilar et al. 1996). Esta técnica consiste brevemente en  
146 deshidratación de las muestras con alcoholes sucesivos (50 a 100%), aclaramiento  
147 con Xilol, inclusión en parafina, obtención de cortes de 5  $\mu\text{m}$ , tinción con H-E y  
148 montaje de las muestras en bálsamo de Canadá. Para analizar las laminillas con las  
149 estructuras gonádicas se empleó un microscopio óptico (Zeiss™, Göttingen,  
150 Germany) con los objetivos 10X, 40X, y las diferencias entre hembras y machos se  
151 basaron en los criterios reportados por Grier y Taylor (1998) y Grier (2000) para *C.*  
152 *undecimalis* y para otras especies de peces teleósteos (Nakamura et al., 1998;  
153 Devlin y Nagahama, 2002; Strüssmann y Nakamura, 2002; y Meijide et al., 2008).

154 *Maduración de hembras.* De cada tratamiento se mantuvieron seis organismos para  
155 evaluar maduración y viabilidad de gametos. A cada organismo le fue implantado  
156 un transmisor pasivo (PIT tag) (Avid Identification Systems, Inc.; Norco, California,  
157 USA) en la cavidad corporal y fueron trasladados a la Estación de Acuicultura  
158 Marina (EAM-UJAT) para crecimiento e inducción al desove. A doce meses de la  
159 reversión, los peces fueron anestesiados usando aceite de clavo ( $0.015 \text{ mL L}^{-1}$ ) y  
160 evaluados para su condición reproductiva. Cada hembra y macho fueron evaluados  
161 tomando ovocitos o esperma mediante canulación. Los peces fueron declarados  
162 maduros cuando en las hembras se observaron ovocitos vitelogénicos y en los  
163 machos cuando se observó esperma fluido. Se midió el diámetro de los ovocitos  
164 colectados y se determinó el estadio de madurez de las hembras.

165 *Calidad del agua.* El oxígeno disuelto, la temperatura y el pH se midieron  
166 diariamente. El oxígeno disuelto ( $6.39 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ) se midió con un multiparámetro  
167 YSI® Modelo 55 (Yellow Springs, OH, EE. UU.), la temperatura ( $31.1 \pm 0.09 \text{ }^\circ\text{C}$ ) con  
168 el termómetro digital del oxímetro y el pH ( $7.1 \pm 0.02$ ) se midió empleando un

169 potenciómetro UltraBasic®, UB-10 (Denver Instrument UB-10, Denver, CO, EUA).  
170 Las concentraciones de amonio ( $0.1 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ), nitritos ( $0.01 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  
171 nitratos ( $0.6 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$ ) se midieron semanalmente, con un equipo  
172 multiparamétrico Hanna Instruments®, HI 98311 (Woonsocket, Rhode Island, USA).  
173 *Análisis estadísticos.* Para determinar el efecto de las diferentes dosis de E2 en la  
174 proporción de sexos y la supervivencia, se empleó la prueba exacta de Fisher para  
175 tablas de contingencia ( $2 \times 4$ ). Para determinar la existencia de diferencias  
176 significativas en el crecimiento (longitud total y peso) entre los diferentes  
177 tratamientos, se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba a  
178 posteriori de Bonferroni de contraste múltiple de promedios de rankings. Todos los  
179 análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statgraphics Centurión  
180 XVIII®, empleándose un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Las gráficas se  
181 construyeron empleando el software SigmaPlot® v 14.0.

## 182 **Resultados**

183 El análisis histológico de las gónadas de adultos de *C. poeyi* tratados con implantes  
184 de estradiol permitió detectar diferencias altamente significativas en el porcentaje  
185 de hembras obtenidas en los tratamientos ( $\chi^2$ ;  $P < 0.001$ ). Los implantes de 2 y 3  
186 mg de E2  $\text{kg}^{-1}$  de pez proporcionaron grupos compuestos al 100 % por hembras,  
187 mientras que en los implantes de 1 mg de E2  $\text{kg}^{-1}$  los porcentajes de hembras fueron  
188 ligeramente menores (87 %). Los peces del grupo control estuvieron compuestos  
189 exclusivamente de machos (100%) (Fig. 1).

190 Al final del experimento, todos los ejemplares revertidos presentaron ovarios  
191 elongados con características normales. A través del análisis histológico se  
192 determinó la presencia de un ovario de tipo sacular (cistovario) con un lumen central.

193 La pared ovárica consistió de lamelas ovígeras orientadas radialmente en dirección  
194 al lumen del ovario, las cuales estuvieron cubiertas por epitelio germinal. Dichas  
195 lamelas consistieron de estroma ovárico (tejido conjuntivo, fibroblastos, vasos  
196 sanguíneos) y ovocitos en estadio de Crecimiento Primario (PG) en etapa de  
197 múltiples nucléolos (PGmn) y con un diámetro promedio de  $59.7 (\pm 2.69 \mu\text{m})$  (Fig.  
198 2A). Los machos del grupo control se caracterizaron por presentar testículos  
199 lobulares en desarrollo avanzado, pues ante una ligera presión abdominal  
200 respondieron liberando esperma fluido. A nivel histológico, los testículos de estos  
201 ejemplares fueron de tipo lobular no restringido, con espermatogonias presentes en  
202 toda la longitud de los lóbulos seminíferos. Dichos testículos presentaron máxima  
203 actividad espermatogénica, con espermatocitos con células en varios estadios de  
204 desarrollo (B espermatogonia, espermatocitos primarios, espermatocitos  
205 secundarios y espermátidas), así como espermatozoides en el lumen de los lóbulos  
206 seminíferos y en los conductos eferentes (Fig. 2B). No se observó ningún tipo de  
207 alteración estructural en los ovarios provenientes de peces tratados con implantes  
208 de E2. A simple vista, los órganos adyacentes como hígado, riñones, sistema  
209 digestivo o tejido conjuntivo presentaron forma, tamaño y apariencia normales.

210 Doce meses después de la reversión sexual, todos los organismos inducidos con 2  
211 y  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  mostraron ovocitos en proceso de maduración. Los ovocitos  
212 vitelogénicos tuvieron un diámetro promedio de  $194.36 \pm 59.26 \mu\text{m}$ , no estando en  
213 condiciones para ser inducidas a desovar. Todos los organismos del grupo control  
214 siguen siendo machos, presentando semen fluido ante presión abdominal.

215 A los tres meses posteriores a la colocación del implante, las variables de  
216 crecimiento (peso y longitud total) mostraron diferencias estadísticas altamente

217 significativas entre los tratamientos (KW,  $P < 0.001$ ) (Tabla 1). La prueba de  
218 Bonferroni indica que los peces que presentaron un crecimiento mayor fueron  
219 aquellos tratados con la máxima concentración de E2 ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), alcanzando una  
220 ganancia en peso de 75.53 g durante los tres meses de investigación, mientras que  
221 los peces del grupo control fueron los que presentaron los valores más bajos de  
222 peso y talla, con una ganancia de 59.34 g. El crecimiento de los peces tratados con  
223 implantes de 1 y  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  fue mayor que los peces del grupo control ( $P < 0.05$ ), pero  
224 menor a los peces con la mayor dosis de E2 ( $P > 0.05$ ). La sobrevivencia observada  
225 fue de 100 % en todos los tratamientos (Tabla 1).

## 226 **Discusión**

227 En el presente estudio se logró la reversión sexual de machos adultos jóvenes de  
228 *Centropomus poeyi* a hembras en organismos nacidos en cautiverio que contaban  
229 con tres años de edad. Los resultados obtenidos muestran la efectividad de los  
230 tratamientos con implantes en concentraciones de 2 y  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  de E2 para inducir  
231 la reversión sexual. Esto confirma la idea de que los machos adultos de esta  
232 especie, al ser un hermafrodita protándrico, presentan células con potencial de  
233 diferenciación hacia hembra.

234 En nuestro laboratorio hemos documentado cambios de sexo de esta especie en  
235 machos adultos grandes (entre 3 y 5 kg de peso) mediante el seguimiento  
236 individualizado de organismos marcados con transmisores pasivos integrados y que  
237 habían sido empleados en desoves inducidos el año anterior como machos  
238 (información no publicada). Esta característica fue propuesta por Sadovy y Shapiro  
239 (1987) como uno de los criterios de identificación de especies hermafroditas  
240 protándricos y fue precisamente ésta característica la empleada por Taylor *et al.*

241 (2000) en *C. undecimalis* para realizar una de las pocas caracterizaciones  
242 detalladas de la reversión sexual en Centropómidos. En ese trabajo los autores  
243 documentaron histológicamente la transición de machos maduros a hembras y  
244 concluyeron que la reversión sexual aparece rápidamente justo después del último  
245 desove como macho y que el desarrollo de ovocitos vitelogénicos completa la  
246 reversión sexual en solo dos meses. En nuestro estudio, los peces revertidos fueron  
247 muestreados a los 90 días de haber sido implantados y presentaron ovarios con  
248 ovocitos en crecimiento primario confirmando una reversión sexual rápida. Un año  
249 después del experimento, los organismos revertidos seguían siendo hembras y  
250 presentaron ovocitos en vitelogénesis.

251 El uso de E2 en la feminización de peces adultos se fundamenta al ser el esteroide  
252 predominante durante el cambio de sexo en peces protándricos (Frisch, 2004) y a  
253 que su síntesis incrementa conforme progresa la reversión sexual de macho a  
254 hembra en algunas especies (Godwin and Thomas, 1993; Nakamura *et al.*, 1998;  
255 Lee *et al.*, 2000). Diversos reportes incluyen información de la lubina asiática, *Lates*  
256 *calcarifer* en condiciones naturales (Guiguen *et al.*, 1993) y en cautiverio (Athauda  
257 & Anderson, 2012); así como del pargo cabeza negra, *Acanthopagrus schlegeli*  
258 (Chang *et al.*, 1994) y el pez payaso, *Amphiprion melanopus* (Godwin & Thomas,  
259 1993; Kim *et al.*, 2012) en condiciones de cautiverio.

260 Los resultados aquí mostrados son similares a los obtenidos por Passini *et al.* (2016)  
261 con machos adultos de *C. undecimalis*; aunque en ese estudio se reportaron dosis  
262 efectivas menores a las empleadas en nuestro experimento (0.5 y 1.0 mg kg<sup>-1</sup>) y  
263 mortalidades importantes en peces que recibieron dosis de 4 y 8 mg kg<sup>-1</sup>.

264 Al término de los tratamientos, todos los individuos que recibieron dosis de 2 y 3 mg  
265  $\text{kg}^{-1}$  de estradiol y algunos con dosis de 1  $\text{mg kg}^{-1}$  presentaron ovarios en desarrollo  
266 conteniendo lamelas bien definidas con grupos de ovocitos perinucleolares. Esto  
267 indica que el E2 indujo la regresión del tejido testicular, favoreciendo además la  
268 proliferación de tejido ovárico. En esta etapa ya no fue posible distinguir remanentes  
269 de tejido testicular pues la gónada en su totalidad presentaba ovocitos en desarrollo.  
270 Al respecto, Sadovy y Shapiro (1987) mencionaron que en especies hermafroditas  
271 protándricos es difícil diagnosticar el cambio de sexo debido a que las  
272 características testiculares estructurales y germinales rara vez permanecen o no  
273 son fáciles de detectar en las gónadas revertidas.

274 El hecho de que se alcanzara una supervivencia del 100% en todos los tratamientos  
275 indica que los niveles de E2 empleados se encuentran por debajo de niveles que  
276 pueden generar daño en órganos e incluso la muerte. Al respecto, se ha  
277 documentado que la administración de hormonas estrogénicas en los procesos de  
278 manipulación sexual, puede impactar el desarrollo de los peces tratados (Piferrer,  
279 2001). En el presente estudio no se observaron anomalías en el tejido gonadal  
280 ni en órganos adyacentes como hígado, riñones, sistema digestivo o tejido somático  
281 en los organismos tratados con E2. Con base a lo reportado por Passini *et al.* (2016),  
282 es posible que el máximo tolerable para centropómidos sea 3  $\text{mg kg}^{-1}$  pues ellos  
283 registraron de un 43 % en peces implantados con 4  $\text{mg kg}^{-1}$  y hasta 100% en  
284 organismos tratados con 8  $\text{mg kg}^{-1}$ . Estos autores indicaron que previo al deceso,  
285 observaron nado errático y aislamiento en los peces afectados y el análisis  
286 histológico mostró daño en el tejido hepático. En este estudio no se observó esta  
287 situación; por el contrario, se observó una ganancia significativa en peso y longitud

288 en peces tratados con E2; siendo esta ganancia aún mayor en los peces con la  
289 dosis de 3 mg kg<sup>-1</sup> con respecto a los peces del grupo control. Esta diferencia puede  
290 atribuirse a un efecto anabólico del estradiol, aunque una vez que los peces dejan  
291 de recibir el estímulo del esteroide se pierde hasta alcanzar un patrón similar, tal  
292 como lo demuestra el estudio de Vidal *et al.*, (*en prensa*) con juveniles de *C. poeyi*  
293 tratados con E2 en la dieta.

294 En un estudio con *Lepomis macrochirus*, se observó un efecto adverso de la  
295 administración de E2 en el crecimiento, aunque directamente relacionado con la  
296 dosis más alta de hormona en la dieta (Wang *et al.*, 2008). Adicionalmente, algunos  
297 autores han señalado cambios en la estructura y morfología de las gónadas  
298 (intersexos y anomalías estructurales como deformaciones) y de otros órganos  
299 como el hígado, así como daños irreversibles en los organismos tratados con E2,  
300 como deformaciones en la columna vertebral, crecimiento lento o mortalidades altas  
301 (Hendry *et al.*, 2003, Islinger *et al.*, 2003, Flynn & Benfey, 2007). En términos  
302 generales, estos autores han demostrado que el efecto de E2 en el crecimiento de  
303 peces tratados con el esteroide puede variar llegando a ser detrimental para los  
304 peces, sin embargo, en el caso de *C. poeyi*, E2 es un estimulador del crecimiento.

305 Los resultados de reversión sexual en *Lates calcarifer* muestran que es posible  
306 obtener poblaciones monosexo de hembras después de la aplicación de implantes  
307 de colesterol conteniendo 8.4 y 44 mg de E2 por kilogramos de peso del pez  
308 (Anderson & Forrester, 2001). En nuestro estudio con *C. poeyi* aplicando implantes  
309 de colesterol con dosis de 2 y 3 mg kg<sup>-1</sup> de E2 se obtienen resultados similares,  
310 pero contrasta con los datos obtenidos en *C. undecimalis* con implantes silásticos a

311 dosis de 0.5, 1.0, 4.0 y 8.0 mg kg<sup>-1</sup> de E2, donde los autores reportan mortalidades  
312 en dosis de 4.0 y 8.0 mg kg<sup>-1</sup> de E2 (Passini *et al.*, 2016).

313 Se ha documentado la relación del aumento de E2 en el plasma sanguíneo y el  
314 cambio de sexo en especies como *Lates calcarifer*, *Acanthopagrus schlegeli*,  
315 *Amphiprion melanopus* y recientemente en *C. undecimalis*, sin embargo, cuando el  
316 esteroide exógeno se hace llegar a los organismos vía implantes la tolerancia puede  
317 variar de especie a especie e incluso con el tipo de implante utilizado. En el caso de  
318 los centropómidos como *C. undecimalis* (Passini *et al.*, 2016) y *C. poeyi* (Vidal-  
319 López *et al.*, En prensa 2018) los niveles óptimos de E2 para alcanzar la reversión  
320 sexual con implantes son cantidades mínimas. En un estudio de inversión sexual  
321 con el pargo cabeza negra (*Acanthopagrus schlegeli*) se encontró tejido testicular  
322 regresivo y tejido ovárico con desarrollo de ovocitos primarios como respuesta a  
323 una concentración de 1 y 4 mg kg<sup>-1</sup> de E2 en el dieta durante 7 meses (Chang *et*  
324 *al.*, 1995). Condeça & Canario (1999) evaluaron la influencia de los estrógenos en  
325 las gónadas de la dorada, *Sparus aurata*, encontrando que la administración de  
326 implantes por 98 días a dosis de 15 mg kg<sup>-1</sup> de E2 por en la dieta induce el desarrollo  
327 de tejido ovárico.

328 La cantidad óptima de E2 y el período de tratamiento para alcanzar la reversión  
329 sexual varían dependiendo de la especie estudiada; sin embargo, el uso de  
330 implantes de liberación controlada en peces adultos presenta ciertas ventajas pues  
331 representa un tratamiento de bajo costo, proporciona un manejo seguro del  
332 esteroide y la elaboración manual de los implantes y su fácil aplicación resulta en  
333 una técnica accesible para los productores de crías en acuicultura. Los resultados  
334 obtenidos por Vidal-López *et al.*, 2012; Passini *et al.*, 2016; Vidal-López *et al.*, 2018



335 y en el presente estudio demuestran que el E2 puede inducir cambios en el  
336 desarrollo temprano de la gónada en peces indiferenciados (feminización) y la  
337 reversión sexual en peces adultos. Al final de los tratamientos, se obtienen  
338 organismos con ovarios en desarrollo y hasta hembras funcionales que pueden ser  
339 empleadas en los procesos productivos de las instalaciones acuícolas (Taylor *et al.*,  
340 1998; Rhody *et al.*, 2013; Vidal-López *et al.*, 2018).

341 La presencia única de machos en el grupo control, aunado a observaciones de  
342 cambio de sexo en cautiverio y datos de la biología reproductiva de la especie  
343 refuerzan la hipótesis de que la especie presenta hermafroditismo protándrico.  
344 Basado en los resultados obtenidos en este estudio y los primeros resultados de  
345 inducción con LHRHa de hembras tratadas con E2 en la dieta (Vidal López *et al.*,  
346 2018), los resultados en el potencial sexual de hembras tratadas con E2 es alto ya  
347 que se pueden obtener hembras a tallas más pequeñas adaptadas al manejo en  
348 cautiverio, lo que permite un mejor control sobre la reproducción inducida en  
349 cautiverio, obteniéndose gametos viables y larvas.

### 350 **Agradecimientos**

351 Esta Investigación es un componente del AquaFish Innovation Lab, quien es  
352 apoyado en parte por la Agencia para el desarrollo Internacional de los estados  
353 Unidos (USAID CA/LWA No. EPP-A-00-06-0012-00) y en parte por las instituciones  
354 participantes. Las opiniones expresadas aquí son de los autores y no  
355 necesariamente reflejan los puntos de vista del AquaFish Innovation Lab o de  
356 USAID. Este estudio también fue parcialmente financiado por la Universidad Juárez  
357 Autónoma de Tabasco (UJAT) y el CONACYT, a partir de una beca de manutención  
358 de doctorado.

359 **Literatura citada**

360 Anderson T.A. & Forrester J. (2001). Administration of oestradiol to Barramundi,  
361 Lates Calcarifer, induced protandrous sex change. In: Proceeding of 14th  
362 International Congress of Comparative Endocrinology, May, 26–30, (ed. by  
363 E.H.J.T. Goos, R.K. Rastogi, H. Vaudry & R. Pierantoni), pp. 155–164. Napoli,  
364 Italy.

365 Athauda S. & Anderson T. (2012). Effect of temperature and salinity on sex inversion  
366 in Asian Seabass (*Lates calcarifer*): relationship with plasma sex steroids  
367 concentration and aromatase activity of gonad and brain. Aquaculture Research  
368 43, 1–11.

369 Álvarez-Lajonchere, L. y, Hernández Molejón, O. G. (2001). Producción de juveniles  
370 de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño,  
371 operación y tecnologías. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 424  
372 p.

373 Cardwell, J. R., & Liley, N. R. (1991). Hormonal control of sex and color change in  
374 the stoplight parrotfish, *Sparisoma viride*. General and comparative  
375 endocrinology, 81(1), 7-20.

376 Cochran R.C. & Grier, H. J. (1991). Regulation of sexual succession in the  
377 protogynous black sea bass, *Centropristis striatus* (Osteichtys: Serranidae).  
378 General and Comparative Endocrinology. 82269-77.

379 Condeça J.B. & Canario A.V.M. (1999). The Effect of Estrogen on the Gonads and  
380 on In Vitro Conversion of Androstenedione to Testosterone, 11 Ketotestosterone,  
381 and Estradiol-17b in *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae). General and  
382 Comparative Endocrinology 116, 59–72.

- 383 Chang C.F., Lee M.F. & Chen G.R. (1994). Estradiol-17b associated with the sex  
384 reversal in Protandrous black porgy, *Acanthopagrus Schlegeli*. Journal of  
385 Experimental Zoology 268, 53–58.
- 386 Chang C.F., Lau E.L. & Lin B.Y. (1995). Stimulation of spermatogenesis or of Sex  
387 Reversal according to the doses of exogenous estradiol 17-b in juvenile males of  
388 protandrous Black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. General and Comparative  
389 Endocrinology 100, 355–367.
- 390 De Carvalho, C. V. A., G. Passini, De Melo Costa, W. & V. R. Cerqueira. (2014a).  
391 Feminization and growth of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed diets  
392 with different concentrations of estradiol-17 $\beta$ . Aquaculture International, 22(4),  
393 1391-1401.
- 394 De Carvalho, C. V. A., G. Passini, W. de Melo Costa, Nunez, B. & V. R. Cerqueira.  
395 (2014b). Effect of estradiol-17 $\beta$  on the sex ratio, growth and survival of juvenile  
396 common snook (*Centropomus undecimalis*). Acta Scientiarum-Animal Sciences  
397 Maringá, 36 (3) 239-245.
- 398 Devlin, R. H. & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in  
399 fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences.  
400 Aquaculture. 208, 191-364.
- 401 Flynn, S. R. & T. J. Benfey. (2007). Effects of dietary estradiol-17 $\beta$  in juvenile  
402 shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*), Lesueur. *Aquaculture*, 270, 405-  
403 412.
- 404 Frisch, A. (2004). Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic  
405 teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 14, 481–499.
- 406 Godwin J.R. & Thomas P. (1993). Sex change and steroid profiles in the protandrous

407 Anemone fish, *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). General and  
408 Comparative Endocrinology 91, 144–157.

409 Guiguen Y., Jalabert B., Thouard E. & Fostier A. (1993). Changes in plasma and  
410 gonadal steroid hormones in relation to reproductive cycle and the sex inversion  
411 process in the Protandrous sea bass, *Lates calcarifer*. General and Comparative  
412 Endocrinology 92, 327–338.

413 Grier, H. J. & R. G. Taylor. (1998). Testicular maturation and regression in the  
414 common snook. J. Fish Biol., 53, 521-542.

415 Grier, H. J. (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common  
416 snook (*Centropomus undecimalis*) (Teleostei: Centropomidae). Journal of  
417 Morphology, 234, 265-281.

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

420 Islinger, M., Wilimsky, D., Völkl, A. & T. Braunbeck. (2003). Effects of 17 $\alpha$ -  
421 Ethynilestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and  
422 cellular ultrastructure of liver and testes in male zebrafish. *Aquatic Tox.*, 62, 85-  
423 103.

424 Kim N.N., Shin H.S., Habibi H.R., Lee J. & Choi C.Y. (2012). Expression profiles of  
425 three types of GnRH during sex-change in the protandrous cinnamon clownfish,  
426 *Amphiprion melanopus*: effects of exogenous GnRHs. Comparative Biochemistry  
427 and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology 161, 124–133.

428 Maldonado-García, M., Gracia-López, V., Carrillo, M., Hernández-Herrera, A., &  
429 Rodríguez-Jaramillo, C. (2005). Stages of gonad development during the

430 reproductive cycle of the blackfin snook, *Centropomus medius* Günther.  
431 Aquaculture Research, 36(6), 554-563.

432 Meijide, F. J., F. L. Lo Nostro, & G. A. Guerrero. (2005). Gonadal Development and  
433 Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei,  
434 Perciforms): A Light- and Electron-Microscopic Study. Journal of Morphology  
435 264:191–210.

436 Nakamura, M., T. Kobayashi, X. T. Chang, & Y. Nagahama. (1998). Gonadal sex  
437 differentiation in teleost fish. Journal of Experimental Zoology, 281:362–372.

438 Strüssmann, C. A. & M. Nakamura. (2002). Morphology, endocrinology, and  
439 environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes.  
440 Physiology and Biochemistry, 26: 13.

441 Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost  
442 fish. Aquaculture. 197, 229-281.

443 Rhody N.R., Neidig C.L., Grier H.J., Main K.L. & Migaud H. (2013). Assessing  
444 reproductive condition in captive and wild common snook stocks: a comparison  
445 between the wet mount technique and histological preparations. Transactions of  
446 the American Fisheries Society 142, 979–988.

447 Taylor R.G., Grier H.J. & Whittington J.A. (1998). Spawning rhythms of common  
448 snook in Florida. Journal of Fish Biology 53, 502–520.

449 Taylor, R. G., Whittington, J. A., Grier, H. J. & R. E. Crabtree. (2000). Age, grow,  
450 maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus*  
451 *undecimalis*, from the east and west coasts of South Florida. Fish. Bull. 98: 612-  
452 624.

453 Passini, G., C. C. Vaz Avelar, S. F. Carneiro, and V. Ronzani-Cerqueira. (2016).  
454 Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males,  
455 using 17- $\beta$  oestradiol implants. *Aquaculture Research*, 47, 1090–1099.

456 Sadovy, Y., & Shapiro, D. Y. (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in  
457 fishes. *Copeia*, 136-156.

458 Vidal-López, J. M., W. M. Contreras-Sánchez, A. A. Hernández-Franyutti,  
459 Contreras-García, M. J., & M. C. Uribe-Aranzábal. (2018). Functional feminization  
460 of the Mexican snook (*Centropomus poeyi*), using 17 $\beta$ -estradiol in the diet. *Latin*  
461 *American Journal of Aquatic Research (LAJAR)* (2100).

462 Vidal-López, J. M., C. A. Álvarez-González, W. M. Contreras-Sánchez, R. Patiño, A.  
463 A. Hernández-Franyutti, U. Hernández-Vidal, & R. Martínez-García. (2012).  
464 Feminización de juveniles del robalo blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch  
465 1792) usando 17- $\beta$ -estradiol. *Revista. Ciencias Marinas y Costeras*, Vol. 4: 83-  
466 93.

467 Wang H.P., Gao Z., Beres B., Ottobre J., Wallat G., Tiu L., Rapp D., O'bryant P. &  
468 Yao H. (2008). Effects of estradiol-17b on survival, growth performance, sex  
469 reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*.  
470 *Aquaculture* 285, 216–223.

**Tabla 1.** Valores promedio de peso, longitud total ( $\pm$  EE) y supervivencia de adultos de *C. poeyi* tratados con implantes de E2 a diferentes dosis al inicio y al final del experimento. El número total de peces por tratamiento fue de 12. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Tratamiento	Longitud Inicial (mm) $\pm$ DE	Longitud Final (mm) $\pm$ DE	Ganancia en Longitud	Peso Inicial (g) $\pm$ DE	Peso final (g) $\pm$ DE	Ganancia en Peso
GC	210.03 $\pm$ 5.01	215.67 $\pm$ 7.89	5.64 <sup>a</sup>	240.06 $\pm$ 25.69	299.40 $\pm$ 6.01	59.34 <sup>a</sup>
1 mg kg <sup>-1</sup>	210.21 $\pm$ 5.05	217.72 $\pm$ 3.51	7.52 <sup>b</sup>	244.07 $\pm$ 21.19	313.41 $\pm$ 3.71	69.33 <sup>b</sup>
2 mg kg <sup>-1</sup>	209.47 $\pm$ 2.73	215.95 $\pm$ 2.62	6.49 <sup>b</sup>	242.47 $\pm$ 20.22	312.70 $\pm$ 2.90	70.23 <sup>b</sup>
3 mg kg <sup>-1</sup>	210.10 $\pm$ 2.09	222.32 $\pm$ 1.97	12.22 <sup>c</sup>	242.20 $\pm$ 19.81	317.73 $\pm$ 2.12	75.53 <sup>c</sup>

Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## Leyendas de figuras

Figura 1. Porcentaje promedio ( $\pm$  error estándar) de las hembras de *C. poeyi* obtenidas mediante implantes con dosis diferentes de E2. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA,  $P < 0.05$ ).  $n=12$  para cada tratamiento.

Figura 2. (A) Vista microscópica general de un corte transversal de testículo y (B) de un ovario de organismo revertido con E<sub>2</sub>. Conducto eferente (ce), esperma (es), tunica albuginea (ta), Lamela (l), ovocitos en desarrollo (ov). Hematoxilina y eosina.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



Figura 1.

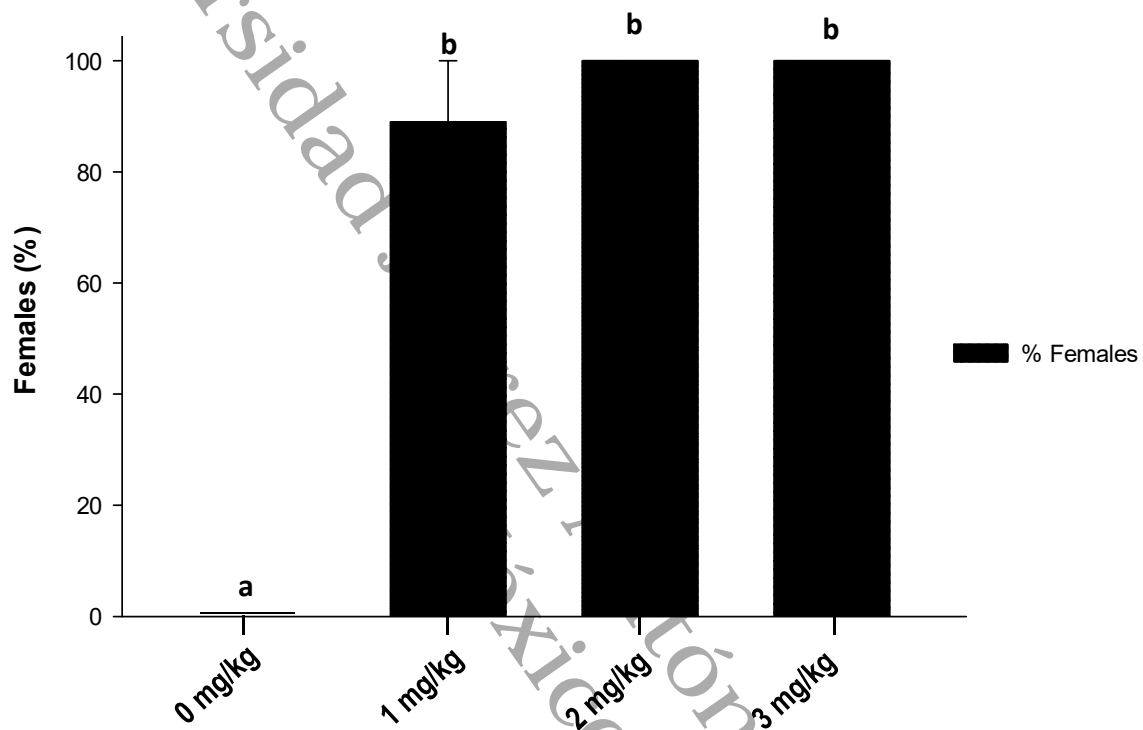
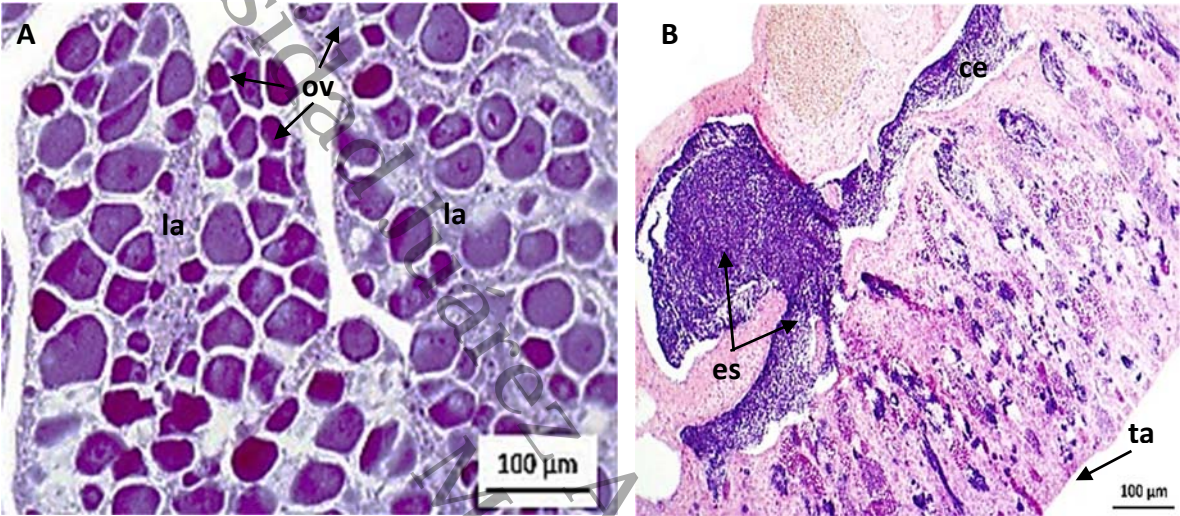


Figura 2.



## **GUÍA PARA AUTORES**

### **GENERAL PUBLISHING INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS**

*Latin American Journal of Aquatic Research* - LAJAR is an "Open Access" journal that publishes in English language, original research articles, reviews and short communications on aquatic science, which contain results of research conducted in aquaculture or in oceanic and coastal marine waters of Latin America.

#### **Types of manuscripts**

LAJAR publishes research articles, review articles and scientific short communications.

**Research Article.** An article should contain an abstract (250 words maximum) and keywords, followed by a text with a defined structure, details of which are given below. Preferably, the manuscript should not exceed 30 pages, including figures and tables.

**Review Article.** Reviews should contain an abstract (250 words maximum) on the state of knowledge of a specific topic of research and keywords, followed by a continuous freestyle text. This manuscript should not exceed 30 pages, including figures and tables.

**Short Communication.** These are short papers on a specific topic that describe preliminary results, new findings or new methodologies. Communications must include an abstract (200 words maximum) and keywords. Different segments of the paper (introduction, methodology, results and discussion) should be written continuously in a single section. Length of the manuscript should be under 10 pages, including figures and tables.

#### **Article structure**

Structure of the manuscript should follow the following order:

**Title:** Brief and descriptive. A running head of no more than 50 characters should be provided.

**Author names and affiliation:** Indicate name, last name (paternal only, when applicable), affiliation, address, and e-mail address of the corresponding author.

**Abstract:** Must contain a maximum of 250 words, indicating purpose, main results or findings and conclusions presented in the manuscript.

**Keywords:** Maximum of six, arranged in order of importance.

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Conclusions (optional)

Acknowledgements

Citations: Consider only published works or in press. References must be ordered chronologically indicating first author's last name and year of publication (e.g., Muñoz *et al.*, 2009; Alvarez, 2010; Johnson & Smith, 2013; Palmer, 2015a,b).

References: Include only documents mentioned in the text, references must be organized alphabetically based on the first author's last name. In the case of two or more authors, initials must be indicated after their last names; use a comma to separate each author.

Examples of different formats for different types of frequently used references:

a) References of articles cited in the text must indicate: author(s), year of publication, article title, complete name of the journal, volume (number between parentheses) and page numbers. Add DOI number if pertinent, to facilitate internet search.

Huang, D. & Roy, K. 2013. Anthropogenic extinction threats and future loss of evolutionary history in reef corals. *Ecology and Evolution*, 3(5): 1-10. doi: 10.1002/ece3.527

Andrade, I., Sangrá, P., Hormazábal, S.E. & Correa-Ramírez, M.A. 2014. Island mass effect in the Juan Fernández Archipelago (33°S), Southeastern Pacific. *Deep-Sea Research I*, 84: 86-99. doi: 10.1016/j.dsr.2013.10.009

b) Book references must indicate: Author(s), year of publication, book title, editorial, city.

Randall, J.E. & Cea, A. 2011. *Shore fishes of Easter Island*. University of Hawaii Press, Honolulu.

c) Articles published in books must indicate: Author(s), year of publication, article title, book title, editorial, city, number of pages.

Andersen, R.A. & Kawachi, M. 2005. Traditional microalgae isolation techniques. In: Andersen, R.A. (Ed.). *Algal culturing techniques*. Academic Press, New York, pp. 83-89.

d) Articles published on the Internet must indicate: Author(s), year of publication, article title, full URL, date of last review.

R Core Team. 2016. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. [<http://www.R-project.org>]. Reviewed: 12 June 2018.

## Figures and tables

Graphics, maps, schemes, drawings or photographs must be referred to as Figure, abbreviated in the text as Fig.

Figures should be numbered consecutively using Arabic numerals; captions should be self-explanatory. Texts and symbols inside a figure must be written in Arial characters and have a size that guarantees legibility in case of downsizing. If the figure includes more than one image, these must be characterized with lowercase letters (e.g., a, b, c, etc.). Figures should be preferably sized as close to the final version as possible. Figures can be a maximum of 15 cm wide by 21 cm high (including caption).

Images (photographs) must be in JPG or PNG format (black and white or color) and be in high resolution (keep to a minimum of 300 dpi) considering an adequate range of tones and contrasts.

Tables in Excel or Word must be numbered consecutively with Arabic numerals. Captions should be self-explanatory. The heading of each column must express clearly its content and measurement units.

## Submission

- Manuscripts are to be submitted exclusively online on the Journal's website ([lajar.ucv.cl](http://lajar.ucv.cl)) (Online Submissions). The manuscript must be written in English, in Microsoft Word format, in Times New Roman size 12, with 1.5 spacing, on letter size paper.
- Tables and figures should be included at the end of the text.
- Authors should suggest a minimum of six potential reviewers of recognized competence in the area of knowledge of the proposed, indicating name and e-mail address.
- Authors must ensure that any submitted article has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere.

## Review Process

Manuscripts are to be submitted exclusively online on the Journal's website ([lajar.ucv.cl](http://lajar.ucv.cl)). Reception of articles will be acknowledged by e-mail to the corresponding author. Before its acceptance, all submitted manuscripts will be assessed by the editor and co-editor in order to determine if they are suitable for the Journal. Documents considered as adequate will enter an evaluation process led by

associate editors with recognized competence in the proposed area of knowledge, considering the opinion of at least two or three international researchers, considered experts in the proposed subject of the manuscript.

Manuscripts will be evaluated as excellent, good, regular or poor, according to the following aspects:

- Originality.
- Relevance to scientific knowledge in aquatic research.
- Formal Aspects: Correct and understandable language. Title and abstract should be sufficiently informative. References must be properly cited.
- Background: Theoretical background is adequate, with clear hypothesis and objectives.
- Methodology: Materials and methods are appropriate and adequately described.
- Results: Data is concise and sufficient. The use of statistics analysis is appropriate.
- Figures: Figures and/or photographs are clear and of good quality, and include only data essential for its comprehension.
- Discussion: Is clear and correctly interpreted.
- References: 70% or more of the references are up to date.

The reviewed article may be: accepted; acceptable with minor changes; acceptable with major changes; or rejected (doesn't meet journal's editorial standards, preliminary results, plagiarism).

If the paper is accepted with minor or major changes, authors will be informed and will have a maximum of 60 days to reply all observations and return a new, corrected version of the manuscript to the corresponding associate editor for a final review.

### **MANUSCRIPTS ACCEPTED FOR PUBLICATION**

Once accepted for publication, authors must forward the final text with all corrections made and accepted by the assigned associate editor.

### **GALLEY PROOFS**

Proofs will be sent by the editor to the corresponding author for a final review. Final correction of the manuscript is the exclusive responsibility of the corresponding author and any modification must be informed to the editor of the journal.

### **PUBLICATION FEE**

Papers accepted are subjected to a publication charge of USD350. This fee is independent of the length of the manuscript and the number of figures and tables. This amount must be paid once the corresponding author has received the print proofs.

## **SUBMISSION PREPARATION CHECKLIST**

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. I have the Chief-Editor presentation letter, signed by corresponding autor.
2. I have the 6 experienced reviewer names required (Name, address, and email), NOTE: you must use the field below entitled "Coments to editor / Reviewer proposal" at the end of this page.
3. The file is in MS Word file type, interlined text at 1.5, Font: Times New Roman 12 pt.
4. I have the short title in the main language of the article.
5. The article title is included in English.
6. The article abstract length is under 250 words, in English, and highlights results and obtained discoveries.
7. I added the 6 keywords required in English ordered by relevance.
8. Article contents are ordered in the following chapters, i.e.
  - o Introduction
  - o Materials and methods
  - o Results
  - o Discussion
  - o Conclusions (optional)
  - o Aknowledgement
  - o References
9. Tables are included in Excel or Word File Type, and their leyends are in English.
10. Figures have 300 dpi as a minimum resolution, placed at the end of the article text with their leyends in English written beneath it, and in the following file types; CoreIDRaw, Excel, Surfer, Sigma plot, JPG or PNG.
11. I accept to pay USD350,00 once upon I receive the galley proofs of my article.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

# CAPITULO 5

Conclusiones Generales



## CONCLUSIONES GENERALES

El cultivo de *C. poeyi* en cautiverio presenta ciertas dificultades que han sido resueltas con el diseño de estudios que permiten evaluar los métodos o protocolos a seguir, y cuáles son los más adecuados para la especie. Sin embargo, obtener recursos para establecer estos estudios no ha sido una tarea fácil, la presente investigación se topa con una serie de limitaciones en cuanto a recursos tanto materiales como humanos y sobre todo de especímenes para llevarse a cabo.

La idea de realizar un estudio que incluyera aspectos reproductivos de *C. poeyi* en cautiverio se planteó meses antes de 2014, la idea original incluyó evaluar el uso de 17- $\beta$  estradiol en larvas (vía bioencapsulado en nauplios de artemia sp), juveniles (vía dieta inerte) y adultos (implantes de colesterol), además describir el desarrollo morfológico de la diferenciación sexual en esta especie mediante análisis de preparaciones histológicas. Una de las problemáticas presentadas fue la falta de reproductores y la temporalidad anual del periodo reproductivo de la especie, por lo que la falta de larvas, juveniles y adultos para realizar la investigación influyó en no realizar el experimento con larvas y la reducción del número de organismos por unidad experimental y tratamiento.

La morfogénesis gonadal de juveniles de robalo mexicano producido y mantenido en condiciones de cautiverio está claramente definida por un período de diferenciación gonadal que puede durar hasta los seis meses de edad, seguidos de un desarrollo testicular prolongado que dura aproximadamente seis meses (180 días). El análisis histológico de la gonadogenesis mostró que esta especie presenta características de un hermafrodita protándrico que comienza su ciclo de vida como macho. La revisión histológica y colecta de muestras se realizó cada siete días para organismos pequeños de hasta 185 días de edad, mientras que, a partir de los 199 días, la revisión y colecta se llevó a cabo cada 14 días. Organismos adultos mantenidos en cautiverio fueron revisados 3 años posteriores a la evaluación histológica, mediante presión manual y canulación, presentando semen fluido y

fueron utilizados en experimentos de inducción, obteniéndose gametos y larvas viables. Los eventos morfológicos documentados durante la diferenciación sexual del robalo mexicano fueron similares a los descritos en otras especies de teleósteos, lo que indica que el proceso de la morfogénesis gonadal es altamente conservado entre los peces, independientemente de la estrategia reproductiva o del grupo. Por lo tanto, nuestra hipótesis general planteada inicialmente se cumple, ya que *C. poeyi* es una especie hermafrodita protándrica que se diferencia a macho a partir de los 178 dpe, su condición hermafrodita queda demostrada al identificar solo evidencias histológicas de desarrollo gonadal donde los únicos cambios morfológicos y estructurales se presentan hacia la formación y diferenciación gonadal de testículos, no registrándose evidencias histológicas de la diferenciación sexual hacia hembra.

El éxito de la feminización con viabilidad reproductiva de las hembras se logró por primera vez en *C. poeyi*. En un principio, se lograron producir poblaciones monosexo 100% hembras mediante la administración de estradiol en dosis de 50 y 60 mg por kilogramos de alimento. Estos son logros importantes para el desarrollo del cultivo del robalo mexicano, ya que las hembras que actualmente se utilizan para la reproducción en cautiverio se obtienen de poblaciones silvestres y requieren entre tres y cuatro años después del confinamiento para responder a la inducción hormonal. Además de esto, la manipulación de los reproductores también es complicada debido al gran tamaño de las hembras. La viabilidad de las hembras se demostró, pues se indujeron desoves y se obtuvieron larvas viables. La producción de pequeñas cantidades de larvas a partir de hembras revertidas sexualmente (aproximadamente 240,000 por hembra) proporciona una solución práctica y manejable durante cada evento de desove.

Por último, la reversión sexual también fue posible a partir de machos adultos jóvenes. Un lote de organismos nacidos en cautiverio que contaban con tres años de edad y confirmados como machos produciendo esperma fluido fueron revertidos a hembras. Los resultados obtenidos muestran la efectividad de tratamientos con implantes elaborados con colesterol en concentraciones de 2 y 3 mg de E2 por

kilogramo de peso corporal para inducir la reversión sexual. A partir de estos tratamientos se obtuvieron poblaciones monosexuales 100% hembras. Esto confirma la idea de que los machos adultos de esta especie, al ser un hermafrodita protándrico, presentan células con potencial de diferenciación hacia hembra.

Cabe señalar que esta investigación es uno de los primeros pasos en la elaboración de un paquete tecnológico para la especie es cuestión, como todo proceso a veces es lento o camina dependiendo del impulso que los investigadores a cargo quieren dar. Estamos convencidos que la información generada por esta investigación será útil para futuros experimentos de manipulación sexual de esta especie con fines acuícolas. Ha sido una bonita experiencia, la cual nos hace pensar que en un futuro no muy lejano podamos ver cultivos de robalo en el sureste mexicano. Contribuir con un granito de arena es este ámbito nos impulsa a contribuir de igual manera en el ámbito en el que nos desarrollamos.